

Die Wechselbeziehung zwischen Aktivierung und Ligandenbindung in HCN2-Schrittmacherkanälen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl.-Biologin Susanne Thon
geboren am 04. 02. 1984 in Mühlhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Benndorf (Institut für Herz-Kreislauf-Physiologie Jena)
2. Prof. Dr. Ingo Dahse (Institut für Biochemie und Biophysik Jena)
3. Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker (Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie Düsseldorf)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.03.2012

Die Naturwissenschaft beschreibt und erklärt
die Natur nicht einfach so, wie sie "an sich" ist.

Sie ist vielmehr ein Teil des Wechselspiels
zwischen der Natur und uns selbst.

Sie beschreibt die Natur, die unserer Fragestellung
und unseren Methoden ausgesetzt ist.

(Werner Heisenberg)

Abkürzungsverzeichnis

τ	Aktivierungszeitkonstante
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
CNBD	Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide
CNG	„ <i>cyclic nucleotide-gated</i> “; von zyklischen Nukleotiden geschaltet
cNMP	zyklisches Nukleotidmonophosphat
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
C_x	Geschlossener Zustand mit x gebundenen Liganden
EC_{50}	Ligandenkonzentration, die einen halbmaximalen Effekt generiert
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
F	Fluoreszenz
F	Faradaykonstante: 96485 C mol^{-1}
F_{\max}	Fluoreszenz bei maximal hyperpolarisierender Spannung und der größten fcAMP-Konzentration
fcAMP	fluoreszierendes zyklisches Adenosinmonophosphat (8-DY547-Aminoethylthio- zyklisches Adenosin 3',5'-Monophosphat)
H	Hill-Koeffizient
HCN	“ <i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated</i> ”; hyperpolarisationsaktiviert und von zyklischen Nukleotiden moduliert
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
I_h	Hyperpolarisations-aktivierter Kationenstrom
I_{\max}	Strom bei maximal hyperpolarisierender Spannung und der größten cAMP-Konzentration
mM	millimolar
MWC-Modell	Monod-Wyman-Changeux-Modell
NL	Anzahl der Liganden
O_x	Offener Zustand mit x gebundenen Liganden
P_o	Offenwahrscheinlichkeit
R	allgemeine Gaskonstante: $8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels

spHCN	HCN-Kanal des Seeigelspermiums
$V_{1/2}$	halbmaximale Spannung
$z\delta$	effektive Ladung eines „gates“

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	7
2.1	Struktur der HCN-Kanäle	7
2.2	Funktionelle Eigenschaften der HCN-Kanäle	9
2.3	Modulation durch zyklische Nukleotide.....	10
2.4	Physiologische Bedeutung.....	12
2.4.1	Rolle der HCN-Kanäle im Herzen.....	12
2.4.2	Rolle der HCN-Kanäle im Nervensystem	14
3	Ziele der Arbeit.....	16
4	Material und Methoden	17
4.1	Nukleinsäurepräparation.....	17
4.2	Verwendete Lösungen und Chemikalien.....	17
4.3	Oozytenpräparation	18
4.4	Elektrophysiologische Messungen	19
4.4.1	Pipettenherstellung	19
4.4.2	Patch-Clamp-Technik.....	19
4.4.3	Konfokale Patch-Clamp-Fluorometrie	20
4.4.4	Datenerfassung	21
4.4.5	Messprotokolle	21
4.5	Datenanalyse.....	23
4.5.1	Bestimmung der <i>Steady-state</i> -Aktivierung	23
4.5.2	Bestimmung der Aktivierungskinetiken.....	24
4.5.3	Bestimmung der Deaktivierung nach cAMP/fcAMP-Entzug	25
4.5.4	Fluoreszenzbilder.....	25
4.5.5	Streuungsmaß	28
4.5.6	Globale Approximation mittels Markov-Modell.....	28
4.5.7	Berechnung der freien Enthalpie nach Gibbs	28
5	Ergebnisse	29
5.1	Spannungsserien bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen.....	29
5.2	cAMP-Sprünge bei verschiedenen Spannungen	33
5.2.1	Aktivierung.....	33
5.2.2	Deaktivierung	35

5.3	Kanalaktivierung und Bindung des fluoreszierenden Liganden fcAMP.....	39
5.3.1	Vergleich von fcAMP und cAMP	39
5.3.2	fcAMP-Bindung bei Kanalaktivierung.....	42
5.3.3	fcAMP-Bindung und -Dissoziation bei Konzentrationssprüngen an aktivierten und nicht aktivierten Kanälen.....	43
5.4	Modellierung der Aktivierungs- und Bindungsverläufe.....	49
5.4.1	Anpassung eines Modells an die Zeitverläufe von Bindung und Aktivierung.....	49
5.4.2	Ablauf der Assoziations- und Dissoziationsprozesse.....	51
5.4.3	Kooperativität der Bindungsschritte.....	53
5.5	Austausch von cAMP gegen fcAMP an den Bindungsstellen.....	56
6	Diskussion.....	59
6.1	Der Effekt des Liganden auf die <i>Steady-state</i> -Aktivierungskurve.....	59
6.2	Kanalverhalten bei [cAMP]-Sprüngen	60
6.3	Aktivierungsbedingte Ligandenbindung	61
6.4	Bindung und Dissoziation bei schnellen Ligandensprüngen.....	62
6.5	Approximation von Bindung und Aktivierung mit einem Markov-Modell...	64
6.6	Dissoziation des physiologischen Liganden cAMP	67
7	Schlussfolgerungen	69
8	Literaturverzeichnis	70
9	Anhang.....	78
9.1	Danksagung	78
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung.....	79

1 Zusammenfassung

HCN (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated*)-Kanäle sind an der Bildung rhythmischer Erregungen in Zellen des Herzens und des Gehirns beteiligt. Die Kanäle sind Kationenkanäle und werden durch hyperpolarisierende Spannungen aktiviert sowie durch zyklische Nukleotide moduliert. Die Bindung des *second messengers* cAMP beschleunigt die Aktivierung, erhöht den Maximalstrom und verschiebt die *Steady-state*-Aktivierungskurve zu positiveren Spannungen.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Anwendung der Patch-Clamp-Technik an *Xenopus laevis* Oozyten die ligandenabhängige Aktivierung und Deaktivierung von HCN2-Kanälen bei verschiedenen spannungabhängigen Aktivierungsgraden zu studieren. Mittels konfokaler Patch-Clamp-Fluorometrie sollte weiterhin das Bindungsverhalten des fluoreszierenden cAMP-Analogons fcAMP untersucht werden, welches die Kanäle in ähnlicher Weise wie cAMP moduliert. Alle somit erhaltenen elektrophysiologischen und fluoreszenzoptischen Daten sollten anschließend unter Anwendung einer globalen Approximationsanalyse zur Etablierung eines geeigneten Markov-Modells herangezogen werden, um das ligandenabhängige Aktivierungsverhalten zu beschreiben.

Es wurde festgestellt, dass sich die cAMP-vermittelte Aktivierungskinetik von HCN2-Kanälen, welche durch eine schnelle Applikation von cAMP-Lösung hervorgerufen wurde, bei stärkerer Voraktivierung durch hyperpolarisierende Spannungen beschleunigt. Umgekehrt verläuft die Aufhebung der Ligandenwirkung nach cAMP-Entzug bei starker Aktivierung viel langsamer als bei geringer Aktivierung. Dies weist auf eine Interaktion zwischen Spannungssensor und der Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD) hin.

Das Bindungsverhalten von fcAMP nach vorangegangener Spannungsaktivierung ist stark konzentrationsabhängig. So dissoziiert die Hälfte der gebundenen Liganden bei der sättigenden fcAMP-Konzentration wesentlich schneller als die verbleibenden 50%. Bei 0,75 μM fcAMP, wo im Mittel nur zwei Liganden pro Kanal gebunden sind, ist fast ausschließlich eine langsame Dissoziation der Liganden zu beobachten.

Mittels globaler Anpassung (Fit) der Zeitverläufe von Aktivierung und Bindung wurde ein Markov-Modell mit allen Geschwindigkeitskonstanten ermittelt. Daraus abgeleitet ist die Affinität für den zweiten und vierten Liganden größer als für den ersten und

dritten Liganden je Kanal. Die Dissoziation des zweiten Liganden stellte sich als besonders langsam heraus.

Durch einen Austausch von cAMP gegen fcAMP bei spannungsaktivierten Kanälen konnte das Bindungsverhalten des physiologischen Liganden cAMP untersucht werden. Dabei werden die cAMP-Moleküle, welche von der CNBD dissoziieren durch fcAMP ersetzt. Zwei der vier gebundenen cAMP-Moleküle dissoziieren extrem langsam von der Bindungsdomäne. Eine komplette Abspaltung der restlichen zwei gebundenen cAMP-Moleküle konnte erst nach Deaktivierung der Kanäle durch eine positivere Spannung beobachtet werden. Da zwei Liganden pro Kanal für den maximalen cAMP-vermittelten Effekt ausreichen, wird durch dieses annähernde Festhalten von zwei cAMP-Molekülen erklärt, warum nahezu keine Deaktivierung des cAMP-abhängigen Stromes nach cAMP-Entzug folgt.

Schlussfolgernd ergibt sich, dass die ligandeninduzierte Aktivierung ein sehr komplexer kooperativer Prozess ist. Möglicherweise ist eine funktionelle Dimerisierung der sequenzgleichen Untereinheiten dafür verantwortlich, dass sie sich so stark in ihren funktionellen Eigenschaften unterscheiden.

2 Einleitung

Bioelektrische zelluläre Schrittmacher steuern für das Leben elementare Prozesse wie den autonomen Herzschlag und den Schlaf-Wachrhythmus (Pape 1996). Bei der Entstehung von zyklisch wiederkehrenden Aktionspotentialen in rhythmisch aktiven einzelnen Zellen spielen hyperpolarisationsaktivierte Kationenströme als Schrittmacherströme eine zentrale Rolle.

Schon in den späten siebziger Jahren des Zwanzigsten Jahrhunderts wurde ein hyperpolarisationsaktivierter Strom im Sinusknoten des Herzens entdeckt, welcher an der rhythmischen Erregungsbildung beteiligt ist (Brown *et al.* 1977, Yanagihara und Irisawa 1980). Auch in den Stäbchen des Auges und in pyramidalen Neuronen des Hippocampus wurde ein ähnlicher hyperpolarisationsaktivierter Kationenstrom gefunden (Bader *et al.* 1979, Halliwell und Adams 1982). Aufgrund der besonderen Eigenschaften dieses Stromes wird er in der Literatur I_h („hyperpolarisationsaktiviert“), I_f („funny“) oder auch I_q („queer“) genannt. Dabei wird dieser Strom aber wahrscheinlich von den gleichen Ionenkanälen produziert (Pape 1996).

Ende der neunziger Jahre wurden die so genannten HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated*) entdeckt, welche genau die wesentlichen genannten Eigenschaften des nativen I_h aufweisen (Gauss *et al.* 1998, Ishii *et al.* 1999, Ludwig *et al.* 1998, Ludwig *et al.* 1999, Santoro *et al.* 1997).

2.1 Struktur der HCN-Kanäle

HCN-Kanäle gehören zu der Superfamilie der spannungsgesteuerten Ionenkanäle (Yu *et al.* 2005). In allen bisher untersuchten Säugetieren wurden vier verschiedene Typen von HCN-Untereinheiten (HCN 1-4) gefunden, welche eine Sequenzhomologie von 80-90% in der zentralen Region aufweisen (Kaupp und Seifert 2001). Auch von Invertebraten konnten Vertreter der HCN-Kanalfamilie kloniert werden, wie z.B. der spHCN-Kanal aus dem Hoden des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* (Gauss *et al.* 1998) oder der HvCNG-Kanal aus der Antenne des Eulenfalter *Heliothis virescens* (Krieger *et al.* 1999).

HCN Kanäle sind eng mit CNG-Kanälen (*cyclic nucleotide-gated*) verwandt (Abb. 1), welche durch Bindung von cAMP oder cGMP an die Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD) in der C-terminalen Region des Kanals geöffnet werden.

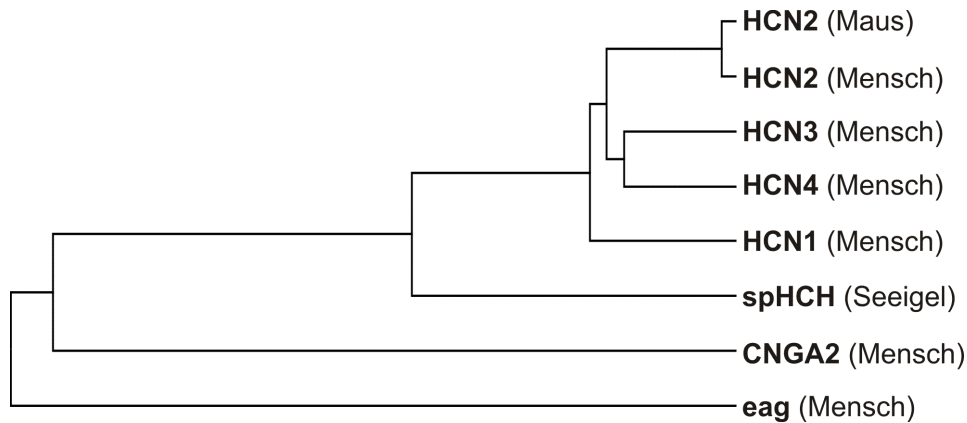


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der HCN-Familie

Dargestellt ist die verwandtschaftliche Beziehung der HCN-Untereinheiten, sowie die verwandtschaftliche Beziehung zu CNG-Kanälen (am Beispiel der CNGA2-Untereinheit) und zu Kaliumkanälen (am Beispiel der eag-Untereinheit). Der phylogenetische Stammbaum wurde anhand der Sequenzhomologien der Aminosäuresequenzen nach der *neighbor joining*-Methode mit MEGA 5.01 (Tamura *et al.* 2011) berechnet und erstellt.

HCN-Kanäle weisen den typischen Aufbau von spannungsgesteuerten Kationenkanälen auf (Yellen 2002). Jede Untereinheit besteht aus sechs transmembranären Helices (S1-S6), wobei das positiv geladene S4-Segment den Spannungssensor darstellt (Abb. 2A). Zwischen dem S5- und S6-Segment befindet sich die ionenleitende Pore mit dem Glycin-Tyrosin-Glycin-Selektivitätsfilter. Am S6-Segment befindet sich C-terminal die intrazellulär gelegene CNBD (Abb. 2A). Vier derartige Kanal-Untereinheiten lagern sich in der Membran zu einem Tetramer zusammen (Abb. 2B). An der engsten Stelle entsteht so ein zentraler Permeationsweg mit dem Selektivitätsfilter (Doyle *et al.* 1998).

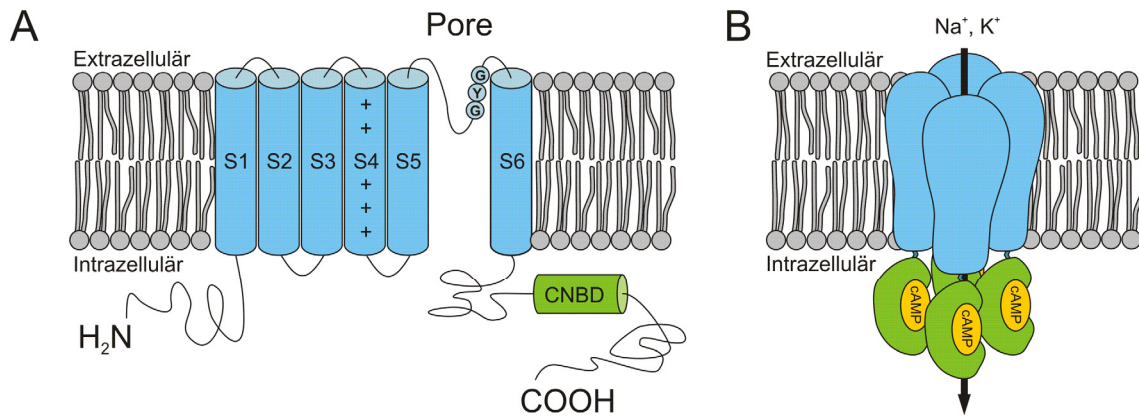


Abb. 2: Schematische Darstellung einer HCN-Untereinheit und eines HCN-Kanals

(A) Dargestellt ist eine HCN-Untereinheit mit sechs Transmembrandomänen S1-S6. S4 stellt den positiv geladenen Spannungssensor dar. Die ionenleitende Pore mit dem GYG-Selektivitätsfilter liegt zwischen S5 und S6. Am intrazellulär gelegenen carboxyterminalen Ende befindet sich die CNBD. (B) Vier Untereinheiten lagern sich zu einem Tetramer zusammen.

2.2 Funktionelle Eigenschaften der HCN-Kanäle

Die verschiedenen HCN-Untereinheiten bilden funktionelle Tetramere mit unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften. Die Vielfalt des nativen I_h ist einerseits durch die Expression der verschiedenen HCN-Gene zu erklären, zum anderen werden wahrscheinlich neben Homotetrameren *in vivo* auch Heterotetramere gebildet (Altomare *et al.* 2003, Chen *et al.* 2001, Proenza *et al.* 2002).

Im Gegensatz zu den verwandten spannungsabhängigen Kationenkanälen, welche bei depolarisierenden Membranpotentialen aktiviert werden, werden HCN-Kanäle durch Hyperpolarisation aktiviert. Das ist bemerkenswert, denn HCN-Kanäle besitzen genau wie depolarisationsaktivierte K^+ - und Na^+ -Kanäle auch eine Abfolge positiv geladener Aminosäuren (Arginin und Lysin) im S4-Segment. Doch während depolarisationsaktivierte Kationenkanäle durch die Lageänderung des S4 in den intrazellulären Bereich sich schließen (Bezánilla 2000), öffnen sich HCN-Kanäle durch eine Einwärtsbewegung des Spannungssensors (Männikkö *et al.* 2002). Bei Depolarisation der Membran werden HCN-Kanäle durch Auswärtsbewegung des Spannungssensors wieder deaktiviert.

HCN-Kanäle leiten sowohl K^+ -Ionen als auch Na^+ -Ionen. Die relative Permeabilität von Na^+ -Ionen gegenüber K^+ -Ionen (P_{Na}/P_K) liegt zwischen 1:3 und 1:5 (Biel *et al.* 2009).

Unter physiologischen Bedingungen findet jedoch hauptsächlich ein Na^+ -Einwärtsstrom statt, da die Spannungsaktivierung nahe dem K^+ -Gleichgewichtspotential und weit vom Na^+ -Gleichgewichtspotential erfolgt. Bis heute ist nicht verstanden, warum HCN-Kanäle Na^+ -Ionen leiten können, obwohl die Porenregion eine beträchtliche Homologie zu den hochgradig selektiven K^+ -Kanälen aufweist. Insbesondere das GYG (Glycin-Tyrosin-Glycin)-Motiv, welches sich wie ein Ring um die Porenregion legt, ist eigentlich charakteristisch für K^+ -selektive Kanäle (Doyle *et al.* 1998). Vermutlich ist die Pore der HCN-Kanäle jedoch weniger starr gestaltet als in K^+ -Kanälen (Wahl-Schott und Biel 2009), wodurch die Na^+ -Ionen passieren können.

Weiterhin sind für den nativen I_h -Strom die Blockierbarkeit durch extrazelluläre Cs^+ -Ionen, die relative Insensitivität gegenüber Ba^{2+} -Ionen (Ludwig *et al.* 1998) und die Modulierbarkeit durch zyklische Nukleotide (siehe 2.3) charakteristisch.

2.3 Modulation durch zyklische Nukleotide

Ein wichtiger Faktor für die Modulation von HCN-Kanälen ist die C-terminal gelegene CNBD und der sogenannte C-Linker, der die CNBD mit dem S6-Segment verbindet. Binden cAMP oder cGMP an die CNBD, kommt es zur Beschleunigung der Aktivierung, die Kanäle werden bei weniger negativen Spannungen aktiviert (Abb. 3A) und der Maximalstrom wird erhöht (DiFrancesco und Tortora 1991, Ludwig *et al.* 1998). Diese Effekte erklärt man dadurch, dass die C-terminale Region mit der CNBD inhibierend auf die Öffnung der HCN-Kanäle wirkt, und die Bindung von zyklischem Nukleotid-Monophosphat (cNMP) diese Inhibition beseitigt. Die verschiedenen HCN-Isoformen reagieren unterschiedlich stark auf die Gegenwart zyklischer Nukleotide. Diese Unterschiede in der cNMP-Sensitivität sind wahrscheinlich auf ein ungleiches Ausmaß der Kanalinhibition durch die CNBD zurückzuführen (Wainger *et al.* 2001).

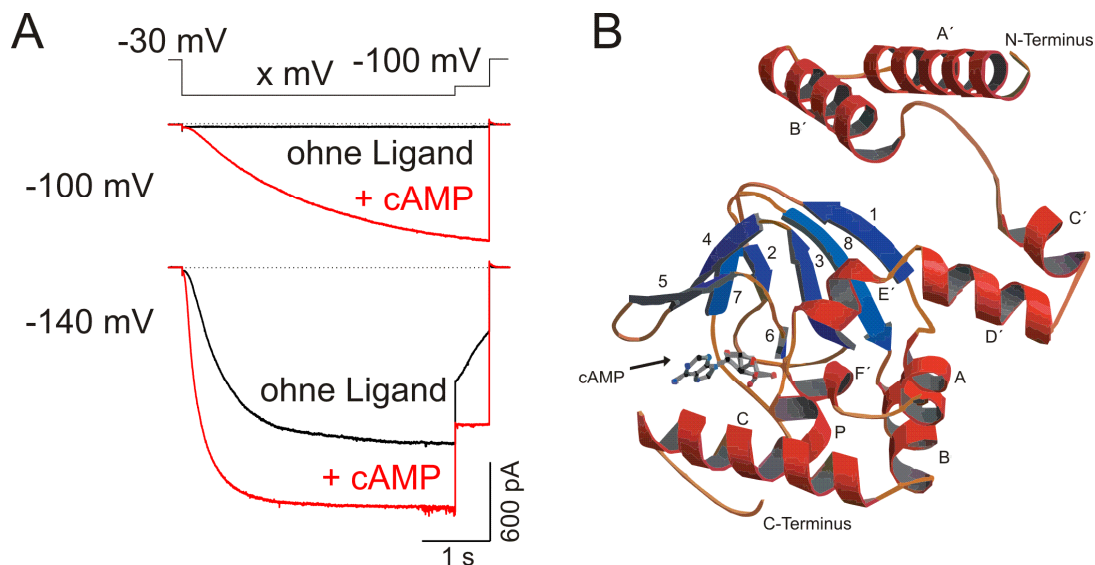


Abb. 3: Wirkung von cAMP auf HCN-Kanäle und Struktur des C-Linkers mit der CNBD

(A) Vergleich der Kanalaktivierung von HCN2-Kanälen bei verschiedenen hyperpolarisierenden Spannungen. Makroskopische Stromantwort ohne cAMP (schwarze Spur) und mit cAMP (rote Spur). (B) Struktur eines C-Linkers mit Zyklonukleotidbindungsdomäne des mHCN2-Kanals mit gebundenem cAMP (verändert nach Zagotta *et al.* 2003).

Die C-terminale Region bildet ein Tetramer mit vierfacher Symmetrie und einer Öffnung entlang der zentralen Achse. Die Anordnung unter der Pore ähnelt vermutlich einer hängenden Gondel (Craven und Zagotta 2006, Sokolova *et al.* 2001).

Die Ermittlung der Kristallstruktur von C-Linker und CNBD in HCN2 (Zagotta *et al.* 2003) hat wichtige Einblicke in die molekularen Mechanismen der cNMP-abhängigen Kanalmodulation gewährt. Der C-Linker besteht aus sechs α -Helices (A'-F'), welche durch kurze Schleifen voneinander getrennt sind (Abb. 3B). Die ersten beiden Helices (A' und B') formen ein antiparalleles „Helix-Turn-Helix“ Motiv, welches mit den nächsten beiden Helices (C' und D') der Nachbaruntereinheit interagiert. So agieren die A'- und B'-Helices einer Untereinheit wie ein „Ellenbogen“, welcher auf einer „Schulter“, den C'- und D'-Helices der benachbarten Untereinheit, liegt.

Die CNBD besteht aus vier α -Helices (A, P, B und C) und acht β -Faltblättern (1-8) zwischen der A- und der B-Helix (Abb. 3B). Die kurze P-Helix wird von dem sechsten und siebten β -Faltblatt flankiert (Zagotta *et al.* 2003). Die zyklischen Nukleotide binden an die so genannte Phosphatbindungskasette. Das ist eine hoch konservierte Region, die von den β -Faltblättern, der P-Helix und der C-Helix gesäumt wird (Berman *et al.* 2005). Sowohl cAMP als auch cGMP kann an die CNBD binden, allerdings wird cAMP in der anti-Konfiguration gebunden und cGMP in der syn-Konfiguration (Zagotta *et al.* 2003).

Bisher sind nur wenige Informationen über die Dynamik des allosterischen Prozesses, welcher cAMP-Bindung mit Kanalöffnung verbindet, vorhanden. In der Kristallstruktur erscheint der C-Linker in einer ruhenden Konformation gefangen; also der Konformation, die auch ohne cAMP-Bindung an die CNBD eingenommen wird. In Abwesenheit von cAMP befindet sich der C-Linker vermutlich in einer kompakten Konformation, welche den inhibitorischen Effekt auf die Kanalaktivierung darstellt. Wahrscheinlich induziert die Bindung von cAMP (und daraus folgend die Konformationsänderung der CNBD) eine Konformationsänderung des C-Linkers. Die resultierende Modifikation der tetrameren Struktur entfernt dann die inhibitorische Wirkung des C-Terminus und fördert den Offenzustand (Craven und Zagotta 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass der beschriebene Prozess aber nicht durch größere Lageveränderungen der Domänen der C-Termini entsteht. Förster-Resonanz-Energietransfer-Messungen bei den verwandten CNG-Kanälen suggerieren, dass die Bewegungen innerhalb des C-Linkers nur mit geringen Lageänderungen verbunden sind (Taraska und Zagotta 2007).

Die Aktivierung von HCN-Kanälen kann durch cGMP in einer ähnlichen Weise hervorgerufen werden wie durch cAMP, es wird jedoch eine vielfach höhere cGMP-Konzentration im Vergleich zu cAMP benötigt. Eventuell kommt diese Bevorzugung von cAMP nicht durch einen begünstigten Kontakt mit dem Protein zustande, sondern sie reflektiert die größere Hydratationsenthalpie von cGMP in Relation zu cAMP. Daraus resultiert ein größerer Energieaufwand für die cGMP-Bindung an die CNBD (Zhou und Siegelbaum 2008).

2.4 Physiologische Bedeutung

2.4.1 Rolle der HCN-Kanäle im Herzen

Die HCN-Isoformen 1 bis 4 konnten bisher in verschiedenen Regionen des Herzens nachgewiesen werden. Doch sowohl das Expressionsmuster als auch die Expressionsstärke der einzelnen HCN-Untereinheiten sind in den Spezies verschieden. Im Sinusknoten aller bisher analysierten Säugetierarten ist HCN4 die Untereinheit, die am stärksten exprimiert wird (Biel *et al.* 2009). HCN4-Kanäle sind scheinbar für etwa 80 Prozent des I_h -Stroms verantwortlich (Shi *et al.* 1999, Thollon *et al.* 2007). Aber nicht nur im Sinusknoten, sondern auch im Vorhof, den Purkinje-Fasern und im

Ventrikel wurden HCN-Untereinheiten detektiert (Ludwig *et al.* 1999, Moosmang *et al.* 2001, Shi *et al.* 1999).

Der Sinusknoten ist der primäre Schrittmacher des Herzens. Dort bewirkt das Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle die Generierung von spontanen, rhythmischen Aktionspotentialen, die den Herzschlag steuern. Die HCN-Kanäle werden durch die Membranhyperpolarisation aktiviert, welche von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen getragen wird. Der dadurch entstehende Kationeneinwärtsstrom depolarisiert die Zelle bis sich spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle öffnen (Abb. 4) und ein erneutes Aktionspotential auslösen (Craven und Zagotta 2006).

Welche Ionenströme für die langsame diastolische Depolarisation im Detail verantwortlich sind, wird jedoch bis heute in der Literatur intensiv diskutiert (Kodama *et al.* 2002, Lakatta und DiFrancesco 2009, Lipsius und Bers 2003). Denn auch den rhythmischen Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum der Zellen des Sinusknotens, der sogenannten „ Ca^{2+} clock“, wird eine wichtige Funktion bei der diastolischen Depolarisation zugeschrieben (Lakatta *et al.* 2010).

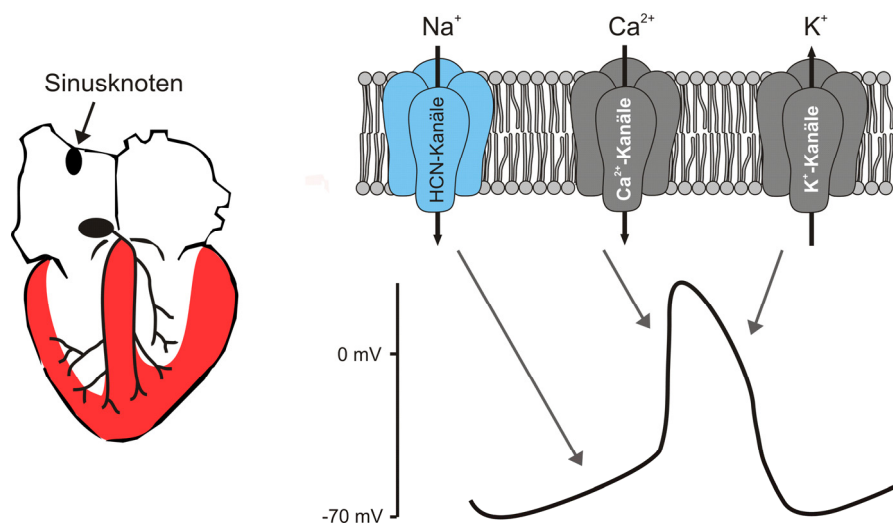


Abb. 4: Rhythmische Erregungsbildung im Sinusknoten des Herzens

Verschiedene Ionenkanäle tragen zur rhythmischen Erregungsbildung im Sinusknoten, dem primären Schrittmacher des Herzens, bei. Die grauen Pfeile zeigen an, welcher Kanal zu welcher Phase des Aktionspotentials beiträgt.

HCN-Kanäle spielen auch bei der Regulation der Herzfrequenz durch das autonome Nervensystem eine wichtige Rolle. Durch Stimulation des Sympatikums kommt es zu einer Adrenalinausschüttung. Das Adrenalin bewirkt an β -adrenergen Rezeptoren über

eine G-Protein-vermittelte Signalkaskade die Aktivierung einer Adenylatzyklase. Diese erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration, welche die Offenwahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle steigert. Die Schwelle der Ca^{2+} -Kanäle wird daher früher erreicht. Durch die somit verkürzte diastolische Depolarisationsphase nach dem Aktionspotential erhöht sich die Herzfrequenz (Brown *et al.* 1979, DiFrancesco 1991, DiFrancesco und Tortora 1991, DiFrancesco und Mangoni 1994). Die Stimulation des Parasympathikus führt hingegen zu einer Ausschüttung von Acetylcholin am Sinusknoten, welches an muskarinische Acetylcholinrezeptoren bindet. Diese hemmen über ein inhibitorisches G-Protein die Adenylatzyklase. Der daraus resultierende Abfall des cAMP-Spiegels bewirkt eine verlangsamte Aktivierung der HCN-Kanäle (DiFrancesco und Tromba 1988, DiFrancesco und Tromba 1988). Entsprechend wird die Schwelle für die Ca^{2+} -Kanäle später erreicht.

2.4.2 Rolle der HCN-Kanäle im Nervensystem

HCN-Kanäle werden fast überall im Gehirn von Säugetieren exprimiert. HCN1 ist vor allem in der Großhirnrinde, im Hippokampus, und im Rückenmark zu finden. HCN2 ist nahezu ubiquitär über die Hirnregionen verteilt, mit höchster Expression in Thalamus und Hirnstamm; während HCN3 nur im *Bulbus olfactorius* und einigen Kernen des Hypothalamus in moderater bis hoher Expression auftritt. HCN4 ist in den Mitralzellen des *Bulbus olfactorius* und in einigen thalamischen Kernen sehr stark vertreten. Alle vier Isoformen sind in der Retina und im Spinalganglion zu finden (Biel *et al.* 2009, Müller *et al.* 2003).

Wie im Sinusknoten des Herzens sind HCN-Kanäle auch in einigen neuronalen Netzwerken und Einzelneuronen an der Bildung rhythmischer Erregung beteiligt (Pape 1996). In Thalamusneuronen z.B. ist der I_h -Strom während der langsamen Depolarisationsphase nach einem Aktionspotential aktiviert und erzeugt im Zusammenspiel mit spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen rhythmische Salven von Aktionspotentialen, die für die Steuerung des Schlaf-Wachrhythmus über den Thalamus wichtig sind (Luthi und McCormick 1998, McCormick und Pape 1990).

Neben der Schrittmacherfunktion tragen HCN-Kanäle auch zur Stabilisierung und Determinierung des Ruhemembranpotentials in vielen Neuronen bei. Durch den I_h -Strom wird das Ruhemembranpotential deutlich positiver als das Kalium-Gleichgewichtspotential. So ist es in thalamokortikalen Relaisneuronen im Vergleich zu

HCN2-*knockout*-Mäusen um ca. 12 mV zu positiveren Potentialen verschoben. Durch die Erhöhung des cAMP-Spiegels kann eine weitere Depolarisation des Ruhemembranpotentials erreicht werden. Somit befindet es sich noch näher an der Schwelle zur Auslösung von Aktionspotentialen (Ludwig *et al.* 2003).

Der I_h -Strom moduliert außerdem die Entstehung exzitatorischer postsynaptischer Potentiale. Durch verstärkte distale Expression entlang des Dendriten von CA1-Neuronen und Pyramidenzellen des Neocortex wird der Einfluss des I_h -Stroms mit steigender Entfernung vom Zellsoma erhöht (Magee 2000).

Des Weiteren können HCN-Kanäle eine Depolarisation nach überschießenden hyperpolarisierenden Reizen veranlassen. Beispielsweise sind die HCN-Kanäle in den Stäbchen der Retina weitgehend für eine schnelle Adaptation an helles Licht verantwortlich (Fain *et al.* 1978).

Im peripheren Nervensystem trägt die Modulation von HCN-Kanälen durch cAMP zur Sensibilisierung der Schmerzempfindung bei Entzündungsreaktionen bei (Ingram und Williams 1996). Aber auch bei der spontanen Schmerzwahrnehmung und bei schmerzhaften peripheren Neuropathien scheinen HCN-Kanäle eine bedeutende Rolle zu spielen (Chaplan *et al.* 2003, Luo *et al.* 2007).

3 Ziele der Arbeit

Die Bindung von cAMP-Signalmolekülen ist ein wichtiger modulatorischer Faktor der HCN-Schrittmacherkanäle. Um zum besseren Verständnis der komplizierten Prozesse der Ligandensteuerung von HCN2-Kanälen beizutragen, hatte die vorliegende Arbeit folgende Ziele:

- (1) Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve von HCN2-Kanälen bei verschiedenen Membranspannungen für den Liganden cAMP
- (2) Bestimmung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken von HCN2-Kanälen bei verschiedenen cAMP-Konzentrationssprüngen und verschiedenen Membranspannungen unter Anwendung der elektrophysiologischen Patch-Clamp-Technik
- (3) Ermittlung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken sowie des Bindungsverhaltens des fluoreszierenden cAMP-Derivats fcAMP an HCN2 Kanälen mittels konfokaler Patch-Clamp-Fluorometrie
- (4) Beschreibung des cAMP-Bindungsverhalten durch cAMP-fcAMP-Austauschexperimente mittels konfokaler Patch-Clamp-Fluorometrie

Sowohl durch Strom- und Fluoreszenzmessungen an in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten HCN2-Kanälen als auch durch mathematische Modellierung sollte ein tieferer Einblick in die komplexen Prozesse von Bindung und Aktivierung gewonnen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Nukleinsäurepräparation

Alle Experimente wurden mit dem HCN2-Kanal der Maus durchgeführt. Die cDNA wurde von Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp bereitgestellt. Von PD Dr. Thomas Zimmer wurde diese in einen Oozytenvektor transferiert und die cRNA bereitgestellt. Die cRNAs wurden bei -80 °C aufbewahrt.

4.2 Verwendete Lösungen und Chemikalien

Barth Medium: 84 mM NaCl; 1 mM KCl; 2,4 mM NaHCO₃; 0,82 mM MgSO₄; 0,41 mM CaCl₂; 0,33 mM Ca(NO₃)₂; 7,5 mM TRIS; Cefuroxim; Penicillin/Streptomycin; pH 7,4 mittels HCl

Barth-Medium Ca²⁺-frei: 82,5 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 5 mM HEPES; pH 7,5 mittels NaOH

Badlösung: 100 mM KCl; 10 mM EGTA; 10 mM HEPES; pH 7,2 mittels KOH

Pipettenlösung: 120 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 10 mM HEPES; pH 7,2 mittels KOH

DY647-Badlösung: 100 mM KCl; 10 mM EGTA; 10 mM HEPES; 0,001mM DY647 (Abb. 5A; Dyomics GmbH, Jena, Deutschland) pH 7,2 mittels KOH

Lösungen mit cAMP wurden mit einem zyklischen Adenosin-3',5'-Monophosphat als Natriumsalz (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA) in den jeweiligen Verdünnungsstufen mit der Badlösung hergestellt. Die verschiedenen fcAMP-Lösungen wurden mit einem Natriumsalz von 8-DY547-Aminoethylthio-zyklischem Adenosin-3',5'-Monophosphat (Abb. 5 B; BIOLOG Life Science Institute, Bremen, Deutschland) mit der DY647-Badlösung hergestellt. Die Emissions- und Absorptionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe sind in Abb. 5C abgebildet.

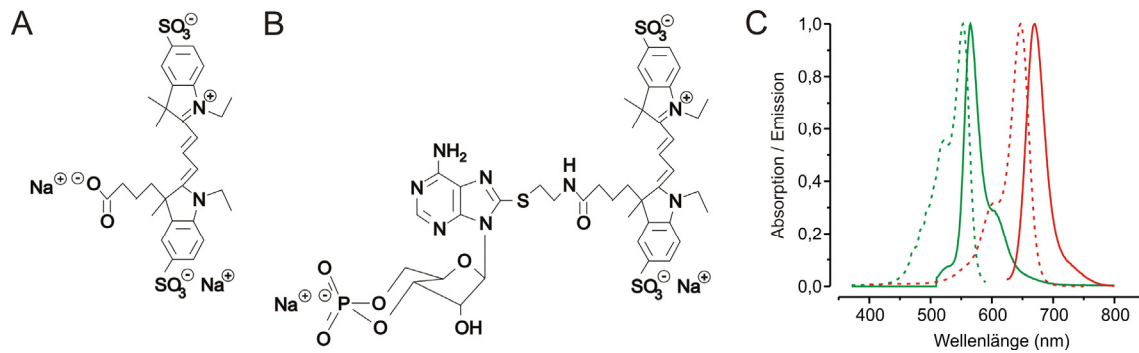


Abb. 5: Fluoreszierende Farbstoffe

(A) Struktur von DY647. (B) Struktur von 8-DY547-Aminoethylthio-zyklischem Adenosin-3',5'-Monophosphat. (C) Absorptionsspektren (gestrichelte Linien) und Emissionsspektren (durchgezogene Linien) der fluoreszierenden Farbstoffe DY647 (rot) und DY547 (grün).

4.3 Oozytenpräparation

Die chirurgische Entnahme von Oozyten aus südafrikanischen Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) erfolgte nach Betäubung mit Tricain. Anschließend wurden die entnommenen Oozyten in Ca^{2+} -freiem Barth-Medium mit Kollagenase (3 mg/ml Kollagenase Typ A; Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) 105 Minuten bei 30 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Nach mehrfachem Spülen mit Barth-Medium wurden die Oozyten manuell vereinzelt, die Follikelmembran mit Hilfe von Pinzetten entfernt und nur Oozyten des Reifestadiums V nach Dumont (Dumont 1972) zur weiteren Verwendung ausgewählt.

Spätestens 24 Stunden nach Entnahme der Oozyten wurde diesen die cRNA-Lösung injiziert. Die Oozyten wurden dann 3-6 Tage in Barth-Medium bei 18 °C inkubiert. Direkt vor den Patch-Clamp-Messungen wurden die Oozyten in Badlösung überführt, und die Vitellinmembran wurde manuell entfernt, um freien Zugang zur Zellmembran zu schaffen.

4.4 Elektrophysiologische Messungen

4.4.1 Pipettenherstellung

Für die Patch-Clamp-Messungen wurden Pipetten aus Quarzkapillaren (Außendurchmesser 1,0 mm, Innendurchmesser 0,7 mm; Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mit dem Mikropipettenziehgerät Model P-2000 (Sutter Instrument, Novato (CA), USA) gezogen.

Die Pipetten für die Patch-Clamp-Fluorometrie-Messungen wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser 2,0 mm, Innendurchmesser 1,0 mm; Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) mit dem Mikropipettenziehgerät Model P-97 (Sutter Instrument, Novato (CA), USA) hergestellt und anschließend über einem heißen Platindraht poliert.

Vor den Messungen wurden die Pipetten mit Pipettenlösung gefüllt. Der Pipettenwiderstand betrug 0,8-2,0 M Ω .

4.4.2 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Messapparatur war auf einem schwingungsgedämpften Labortisch montiert und von einem Faraday-Käfig umgeben. Alle elektrophysiologischen Messungen wurden bei Raumtemperatur an Oozyten des Afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) durchgeführt. Die Oozyte befand sich bei der Messung in einer Kammer, welche mit Badlösung gefüllt war. Als Kammerboden diente ein Deckgläschen, durch welches man mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 100, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) den Patchvorgang kontrollieren konnte. Die Lösungen wurden durch ein Applikationssystem aus Kanülen zugeführt, und der Kammerüberstand wurde abgesaugt. Die schnellen Lösungswechsel wurden über eine piezoelektrisch gesteuerte zweikanalige Pipette, hergestellt aus Theta-Glaskapillaren (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) erreicht (Sakmann und Neher 1995).

Die mit Pipettenlösung gefüllte Patchpipette wurde in einen Pipettenhalter eingesetzt, in dem sich ein chlorierter Silberdraht befand, der in die Pipettenlösung eintauchte. Der Silberdraht war mit dem Vorverstärker (*head stage*) des Patch-Clamp-Verstärkers (Axopatch 200B, Axon Instruments Inc., Foster City (CA), USA) verbunden, welcher an einem Mikromanipulator (SM1, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland)

angebrachte war. Als Badelektrode wurde ein Silber/Silberchlorid-Pellet (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) verwendet. Die Signale wurden mit einem 5 kHz- bzw. 2 kHz-Tiefpass-Besselfilter (4-polig) gefiltert.

Bevor die Pipette in die Badlösung eintauchte, wurde über eine Spritze ein Überdruck am Pipettenhalter angelegt, um die Pipettenspitze vor eventuellen Verschmutzungen zu schützen. Die Patchpipette wurde anschließend direkt an die Zellmembran der in der Badlösung befindlichen Oozyte herangeführt, und der Überdruck wurde abgelassen. Wenn sich zwischen dem Inneren der Pipette und der Außenlösung nicht sofort ein elektrischer Widerstand in der Größenordnung von mehreren Gigaohm (*Gigaseal*) bildete, wurde ein geringer Unterdruck angelegt. Nach Entstehung des *Gigaseals* wurde der Patch, mittels Mikromanipulator aus der Oozyte herausgerissen (*inside-out*-Konfiguration) und an das jeweilige Applikationssystem geführt. Nach dem Exzidieren des Patches wurde 3,5 Minuten bis zum Beginn der Messungen gewartet, um den Einfluss des sogenannten „*run-downs*“ (DiFrancesco *et al.* 1986) gering zu halten.

4.4.3 Konfokale Patch-Clamp-Fluorometrie

Durch Kombination von Patch-Clamp-Fluorometrie (Zheng und Zagotta 2000) und konfokaler Mikroskopie (Abb. 6) kann der durch die Membran fließende Strom gleichzeitig mit der Bindung fluoreszierender Liganden an Kanalproteine gemessen werden (Biskup *et al.* 2007).

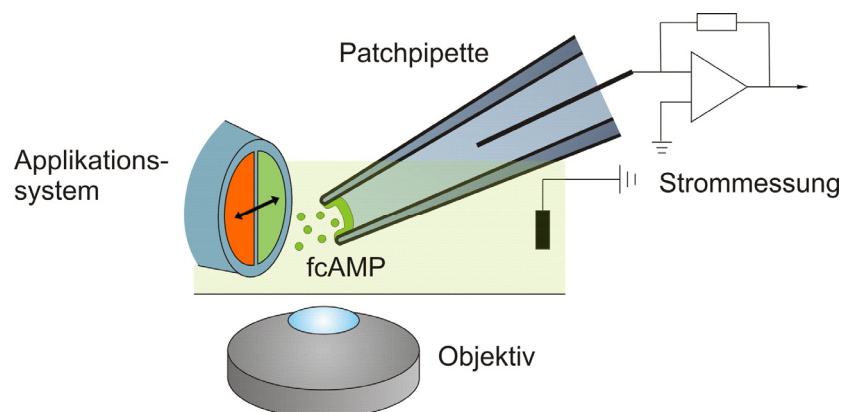


Abb. 6: Simultane Messung der Ionenströme und der fcAMP-Bindung

Die Skizze zeigt den Messaufbau der konfokalen Patch-Clamp-Fluorometrie. Die Bindung des fluoreszierenden Liganden wird über ein konfokales Fluoreszenzmikroskop detektiert. Durch eine Piezo-gesteuerte zweikanalige Pipette kann ein schneller Lösungswechsel erfolgen.

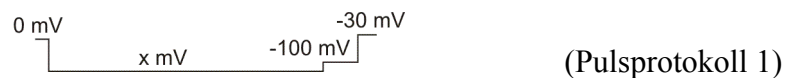
Die elektrophysiologischen Daten wurden wie unter 2.4.2 beschrieben ermittelt. Die Messkammer befand sich auf dem Objektisch eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 100 + LSM 510 Scankopf; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland). Für die Fluoreszenzmessungen wurde ein C-Apochromat 40x Wasserimmersionsobjektiv (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. Die Anregung des fcAMP erfolgte bei 543 nm mit einem Helium-Neon-Laser. Das Fluoreszenzsignal wurde durch einen BP560-615-Filter geleitet. DY647 wurde bei 633 nm mit einem Helium-Neon-Laser angeregt und das Fluoreszenzsignal durch einen LP650-Filter geleitet. Um eine Bildebene von 6 μm zu aufnehmen, wurde die Lochblende auf einen Durchmesser von 500 μm justiert. Vor Beginn der Messung wurde die Pipette direkt vor eine Öffnung der Zweikanallösungspipette bewegt und der freie Patch, welcher sich am Scheitelpunkt befindet, fokussiert.

4.4.4 Datenerfassung

Für die Erfassung der elektrophysiologischen Daten sowie die Gestaltung der Pulsprotokolle wurden die Programmpakete ISO2 bzw. ISO3 (MFK, Niedernhausen, Deutschland) verwendet. Die Fluoreszenzbilder wurden über die LSM 510 Software erfasst.

4.4.5 Messprotokolle

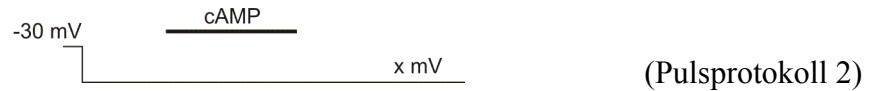
Die Spannungsserien bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen wurden mit Pulsprotokoll 1 gemessen.



Von einem Haltepotential von 0 mV ausgehend wurde über 4 s eine Spannung von x mV (-50 mV bis -150 mV) appliziert. Für 0,5 s folgte dann eine Spannung von -100 mV, woraufhin zurück zum Haltepotential geklemmt wurde. Zwischen den Pulsen wurde eine Pause von 4,5 s eingelegt. Nach dem Durchlaufen einer Spannungsserie

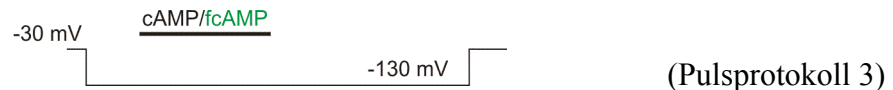
(von -70 mV bis -150 mV) in der Badlösung wurde der Patch von einer cAMP-Lösung umspült, und eine erneute Spannungsserie wurde gemessen.

Die cAMP-bedingte Aktivierung und Deaktivierung wurde mit Pulsprotokoll 2 gemessen.



Nach der Spannungsaktivierung von dem Haltepotential (-30 mV) auf eine Spannung zwischen -90 mV und -140 mV (x mV) wurde 0,1 μ M, 1 μ M oder 10 μ M cAMP appliziert. Die Zeiten der initialen Spannungsaktivierung und der cAMP-bedingten Aktivierung wurden je nach Membranspannung und cAMP-Konzentration variabel bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes gestaltet (12 s bis 120 s). Nach cAMP-Entzug wurde die Stromspur so lange, wie es die Qualität des Patches zuließ, bei der entsprechenden Testspannung weitergemessen.

Sowohl für die fcAMP-abhängigen Aktivierungs- und Deaktivierungsmessungen als auch für die zugehörigen Vergleichsmessungen mit cAMP wurde Pulsprotokoll 3 verwendet.



Vom Haltepotential -30 mV ausgehend wurde eine nahezu maximale Spannungsaktivierung auf -130 mV ausgeführt. Nach 7 bzw. 8 Sekunden Spannungsaktivierung wurde eine Ligandenkonzentration von 0,075 μ M, 0,75 μ M oder 7,5 μ M angespült, bis ein annähernder Gleichgewichtszustand erreicht wurde. Nach einem Lösungswechsel auf die Badlösung ohne Liganden erfolgte 9 Sekunden später ein Spannungssprung zum Haltepotential. Bei den Messungen mit fcAMP wurde beim Haltepotential von -30 mV die jeweilige fcAMP-Lösung nochmals für 5 bis 13 Sekunden angespült.

4.5 Datenanalyse

4.5.1 Bestimmung der *Steady-state*-Aktivierung

Zur Bestimmung der *Steady-state*-Aktivierung bei verschiedenen Membranspannungen und cAMP-Konzentrationen wurde Pulsprotokoll 1 verwendet. Um den Einfluss des elektrochemischen Gradienten auszuschalten, wurden Aktivierungswerte bei -100 mV ausgewertet, welche direkt nach der variablen Spannung folgten (*tail*-Strom). Die Aktivierungswerte der stärksten depolarisierenden Spannung wurden dann jeweils abgezogen, und die Werte der stärksten hyperpolarisierenden Spannung bei sättigender cAMP-Konzentration wurden als absoluter Maximalwert gesetzt. Um die Auswirkungen des *run-downs* so gering wie möglich zu halten, wurde für die Normierung je eine Stromspur bei allen cAMP-Konzentrationen mit dem oben genannten Pulsprotokoll bei -130 mV gemessen. So konnte in kurz aufeinander folgenden Zeitintervallen der Einfluss der cAMP-Konzentration auf den absoluten Maximalstrom ermittelt werden.

Die normierte Stromamplitude I/I_{\max} wurde in Abhängigkeit von der Membranspannung (V) über eine modifizierte Boltzmann-Gleichung (Gleichung 1) mit Origin 8G (OriginLab, Northampton (MA), USA) approximiert.

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{I_{\max, \text{SättSp}}}{\left(1 + e^{\left(\frac{z\delta F(V - V_{1/2})}{RT}\right)}\right)} \quad (1)$$

Dabei ist $I_{\max, \text{SättSp}}$ der jeweilige maximale Strom bei sättigender Spannung, $z\delta$ die effektive *Gating*-Ladung und $V_{1/2}$ die Spannung bei halbmaximaler Aktivierung ist. F ist die Faraday-Konstante, R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur.

Weiterhin wurde der relative Strom I/I_{\max} auch in Abhängigkeit von der cAMP-Konzentration über eine modifizierte Hill-Funktion (Gleichung 2) mit Origin 8G approximiert.

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{I}{I_{\max, 0cAMP}} + \frac{\left(\frac{I}{I_{\max, \text{SättcAMP}}} - \frac{I}{I_{\max, 0cAMP}} \right)}{\left(1 + \left(\frac{EC_{50}}{x} \right)^H \right)} \quad (2)$$

Dabei ist $I_{\max, \text{SättcAMP}}$ der jeweilige Strom bei cAMP-Sättigung und $I_{\max, 0cAMP}$ der Strom ohne cAMP. Der Hill-Koeffizient (H) und die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) konnten so ermittelt werden.

Um die Verschiebung der *Steady-state*-Aktivierung herauszufinden, wurde für jede einzelne Spannungsserie mittels einer modifizierten Boltzmann-Gleichung (Gleichung 1) die Spannung bei halbmaximaler Aktivierung ($V_{1/2}$) berechnet. Dann wurde jeweils der $V_{1/2}$ -Wert der dazugehörigen Aktivierungskurve ohne cAMP abgezogen und man erhielt die Verschiebung für die jeweilige cAMP-Konzentration.

4.5.2 Bestimmung der Aktivierungskinetiken

Die spannungsabhängigen Aktivierungskinetiken bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen wurden mit der Software ANA3 (MFK, Niedernhausen, Deutschland) bestimmt. Nach einer initialen Verzögerung wurden die Ströme monoexponentiell (Gleichung 3) beschrieben.

$$y = A \cdot e^{(-t/\tau_{\text{akt}})} \quad (3)$$

Die Bestimmung der cAMP/fcAMP-abhängigen Aktivierungskinetiken erfolgte mit einer Software, die von Prof. Dr. Eckhard Schulz auf Basis von MATLAB (MathWorks Inc, Natick (MA), USA) zur Verfügung gestellt wurde. Nach einer Rauschkorrektur wurden die cAMP/fcAMP-abhängigen Aktivierungskinetiken mono- bzw. biexponentiell (Gleichung 3 und 4) beschrieben.

$$y = A_1 \cdot e^{(-t/\tau_{\text{akt1}})} + A_2 \cdot e^{(-t/\tau_{\text{akt2}})} \quad (4)$$

Zum Vergleich mit monoexponentiell beschriebenen Daten wurde teilweise die mittlere Aktivierungszeitkonstante τ_{mittel} aus biexponentiellen Fits berechnet (Gleichung 5).

$$\tau_{\text{mittel}} = \frac{A_1\tau_1 + A_2\tau_2}{A_1 + A_2} \quad (5)$$

Dabei stellen τ_1 und τ_2 die schnelle bzw. langsame Zeitkonstante und A_1 und A_2 die Amplitude der jeweiligen Zeitkonstante der biexponentiellen Approximation dar.

Für die Berechnung der Aktivierungsgeschwindigkeit t_{10-90} wurde die Zeit bestimmt, in der der Strom von 10 auf 90% der Maximalamplitude ansteigt.

4.5.3 Bestimmung der Deaktivierung nach cAMP/fcAMP-Entzug

Zur Bestimmung der Deaktivierung nach cAMP/fcAMP-Entzug wurden die einzelnen Abschnitte (Spannungsaktivierung, cAMP/fcAMP-abhängige Aktivierung und Deaktivierung nach cAMP/fcAMP-Entzug) der Stromspur korrigiert und approximiert (monoexponentiell, biexponentiell und linear). Als Nullwert wurde der letzte Wert der Approximationen der Spannungsaktivierung angenommen und der Maximalwert wurde als letzter Wert des Fits der cAMP/fcAMP-abhängigen Aktivierung definiert. Die Deaktivierung der cAMP/fcAMP-abhängigen Stromkomponente wurde anhand der Approximationen der Deaktivierung nach cAMP/fcAMP-Entzug ermittelt. Dies erfolgte prozentual zwischen null und Maximalwert.

4.5.4 Fluoreszenzbilder

Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte mit einer im Labor entwickelten Software auf Basis von MATLAB (MathWorks Inc, Natick (MA), USA). Vor der Auswertung der Fluoreszenzbilder wurde eine Korrektur der Pipettenposition vorgenommen, falls diese sich über die Zeit veränderte.

Ein Anstieg der fcAMP-Fluoreszenz (grüner Fluoreszenzkanal) wurde nur in Patches mit HCN2-Kanälen beobachtet (Abb. 7A). In Kontrollloozyten ohne HCN2-Expression war ein derartiger Anstieg nicht zu beobachten. Um die Fluoreszenzintensität des an den HCN2-Kanal gebundenen fcAMPs von dem ungebundenen fcAMP in der Lösung zu trennen, wurde gleichzeitig der rot fluoreszierende Referenzfarbstoff DY647 (roter Fluoreszenzkanal, Abb. 7B) appliziert (Biskup *et al.* 2007, Kusch *et al.* 2010). Eine Überlagerung des roten und des grünen Fluoreszenzbildes (Abb. 7C) macht deutlich,

dass im Patch mit HCN2-Kanälen eine stärkere Fluoreszenz im grünen Kanal im Vergleich zum roten Kanal sichtbar ist, da in diesem Fall fcAMP an die Kanalproteine bindet, der Referenzfarbstoff jedoch nicht. Zur Quantifizierung des gebundenen fcAMPs wurde die fcAMP-Fluoreszenz und die DY647-Fluoreszenz *offset*-korrigiert. Anschließend wurde die DY647-Fluoreszenz auf den Verlauf der fcAMP-Fluoreszenz außerhalb der Membran skaliert. Zur Veranschaulichung ist eine eindimensionale schematische Darstellung des Skalierungsverfahrens in Abb. 7D zu sehen. Die skalierte rote Fluoreszenz wurde in jedem Punkt des Patches von der grünen Fluoreszenz abgezogen. Im Differenzbild in Abb. 7E ist nur noch die Fluoreszenz des gebundenen fcAMP (ΔF) sichtbar. Für die quantitative Ermittlung des gebundenen fcAMPs über die Zeit wurde nur der freie Patch ausgewertet. Dieser wurde von der Software automatisch anhand der Steilheit des Fluoreszenzabfalles ermittelt (Abb. 7F).

Es wurde angenommen, dass bei maximaler Fluoreszenz im Differenzbild alle Bindungsstellen für zyklische Nukleotide besetzt sind, da auch mit einer höheren fcAMP-Konzentration keine Fluoreszenzsteigerung mehr möglich war (Kusch *et al.* 2010).

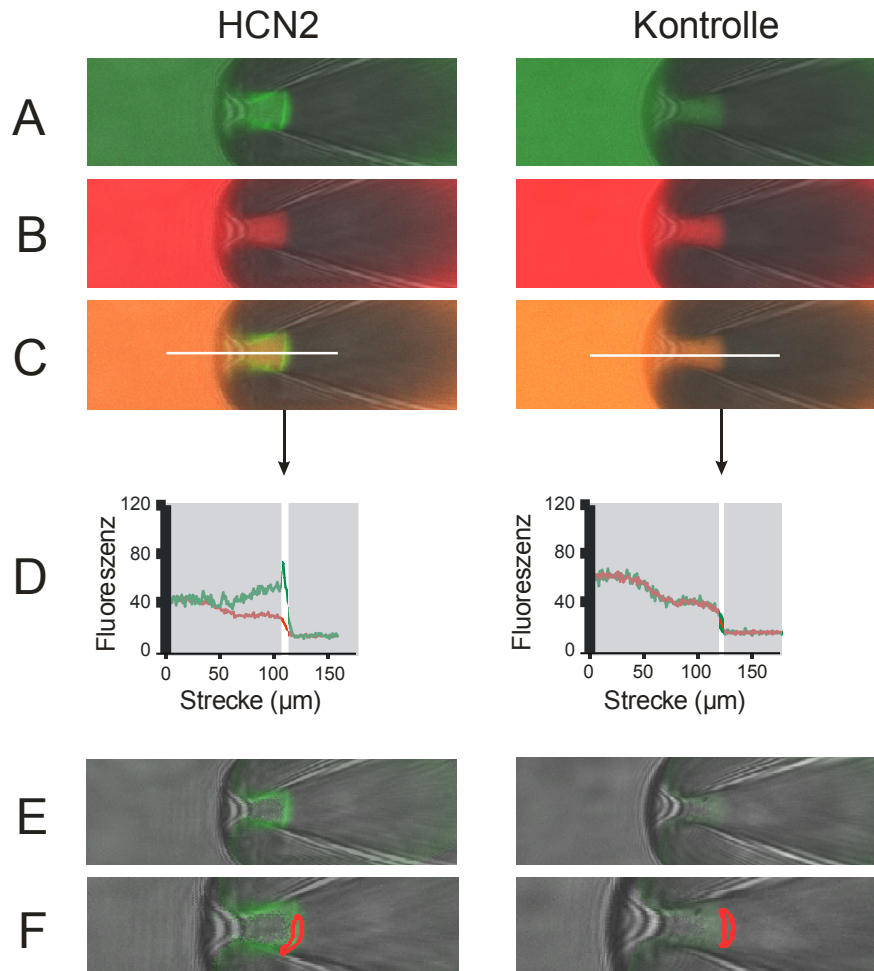


Abb. 7: Repräsentative Beispiele für konfokale Bilder der fcAMP-Bindung in Patches mit HCN2-Kanälen und Kontrollpatches bei -130 mV Membranspannung in 0,75 μ M fcAMP-Lösung (verändert nach Kusch *et al.* 2010)

(A) Überlagerung der grünen (fcAMP) Fluoreszenz mit dem Transmissionsbild. (B) Überlagerung der roten Fluoreszenz (DY647 in Badlösung) mit dem Transmissionsbild. (C) Überlagerung der grünen Fluoreszenz mit der roten Fluoreszenz und dem Transmissionsbild. (D) Darstellung des Skalierungsverfahrens in einer Dimension. Die Fluoreszenzintensität der roten Fluoreszenz wurde auf die der grünen Fluoreszenz entlang der weißen Linie in Feld C skaliert. (E) Differenzbild zwischen der fcAMP-Fluoreszenz und der normalisierten DY647-Fluoreszenz. (F) Vergrößertes Differenzbild von Feld E. Die rote Maske zeigt den ausgewerteten Teil des Patches an.

Bindungskinetiken wurden mit Origin 8G mono- oder biexponentiell (Gleichung 3 und 4) beschrieben.

Bei Fluoreszenzmessungen mit der Piezo-gesteuerten zweikanäligen Pipette wurden jeweils die Fluoreszenzpunkte, in denen der Lösungswechsel stattfand, durch die Mittelwerte der vorherigen fünf bis zehn Fluoreszenzpunkte ersetzt.

4.5.5 Streuungsmaß

Bei der Angabe des Streuungsmaßes wurde immer der Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) verwendet. Fehlerfortpflanzungen wurden berücksichtigt.

4.5.6 Globale Approximation mittels Markov-Modell

Anhand der gemittelten Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken sowie des Bindungs- und Dissoziationsverhaltens des fluoreszierenden Liganden bei 0,075, 0,75 und 7,5 μM fcAMP und -130mV wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Eckhard Schulz durch globale Approximation verschiedener Markov-Modelle das am besten passende Modell ermittelt. Die Vorgehensweise ist in den ergänzenden Informationen zu Kusch *et al.* 2011 nachzulesen.

4.5.7 Berechnung der freien Enthalpie nach Gibbs

Die freie Enthalpie nach Gibbs wurde mit Gleichung 6 berechnet.

$$\Delta G = -RT \ln X \quad (6)$$

Dabei ist R die Gaskonstante, T die Temperatur und X ist entweder die Assoziationsgleichgewichtskonstante (K_A) oder die Gleichgewichtskonstante der Offen-Geschlossen-Isomerisierung (E_x) für eine x-fache Ligandierung.

5 Ergebnisse

5.1 Spannungsserien bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen

Makroskopische Ströme von HCN2-Kanälen werden bei hyperpolarisierenden Membranspannungen zwischen -50 mV und -150 mV in Schritten von 10 mV gemessen. Diese Spannungsserien wurden bei cAMP-Konzentrationen von 0,01 bis 100 μM cAMP wiederholt (Abb. 8). Der *tail*-Strom wurde bei -100 mV aufgezeichnet. *Tail*-Ströme bei vorher applizierten nicht aktivierenden Spannungen wurden zur Leckstromkorrektur verwendet.

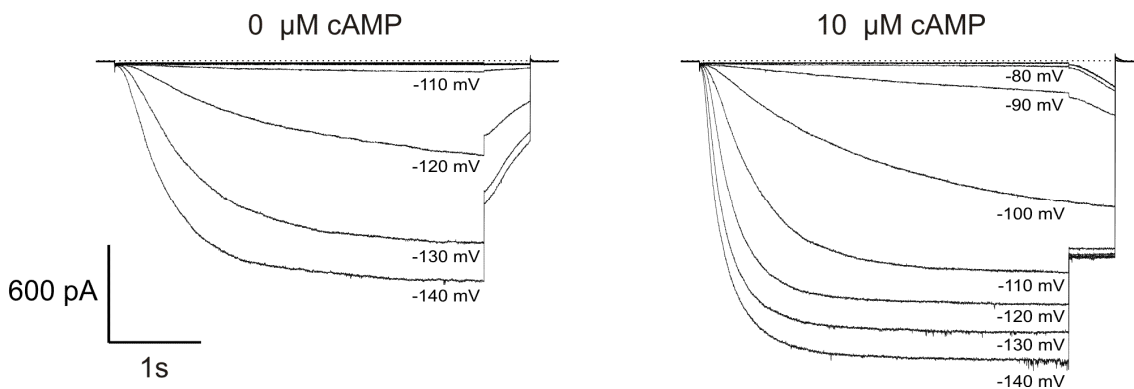


Abb. 8: Vergleich einer Spannungsserie ohne Zugabe von cAMP und mit Zugabe einer sättigenden cAMP-Konzentration von 10 μM .

Stromspuren bei Membranspannungen von -50 mV bis -140 mV mit folgendem *tail*-Strom bei -100 mV.

Um die Strom-Spannungsbeziehung bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen darzustellen, wurde die initiale Amplitude des *tail*-Stroms ausgewertet (Abb. 9A). Über die Beschreibung mit einer modifizierten Boltzmann-Gleichung (Gleichung 1) konnten die Spannung bei halbmaximaler Aktivierung ($V_{1/2}$) und die effektive *Gating*-Ladung ($z\delta$) ermittelt werden (Tabelle 1). Die *Steady-state*-Aktivierung wurde durch cAMP zu positiveren Spannungen verschoben, und der Maximalstrom wurde erhöht. Bei der berechneten effektiven *Gating*-Ladung konnte keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden.

Weiterhin wurden die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bei verschiedenen Spannungen aufgetragen (Abb. 9B). Über die Hill-Funktion (Gleichung 2) wurden die

jeweilige Ligandenkonzentration des halbmaximalen Effektes (EC_{50}) sowie der Hill-Koeffizient H ermittelt (Tabelle 2). Während der EC_{50} -Wert bei stärker hyperpolarisierenden Membranspannungen abfällt, steigt der Hill-Koeffizient an und ist bei einer Spannung von -120 mV und negativeren Spannungen größer als 1. Dies weist auf eine positive Kooperativität im *Gating*-Mechanismus hin.

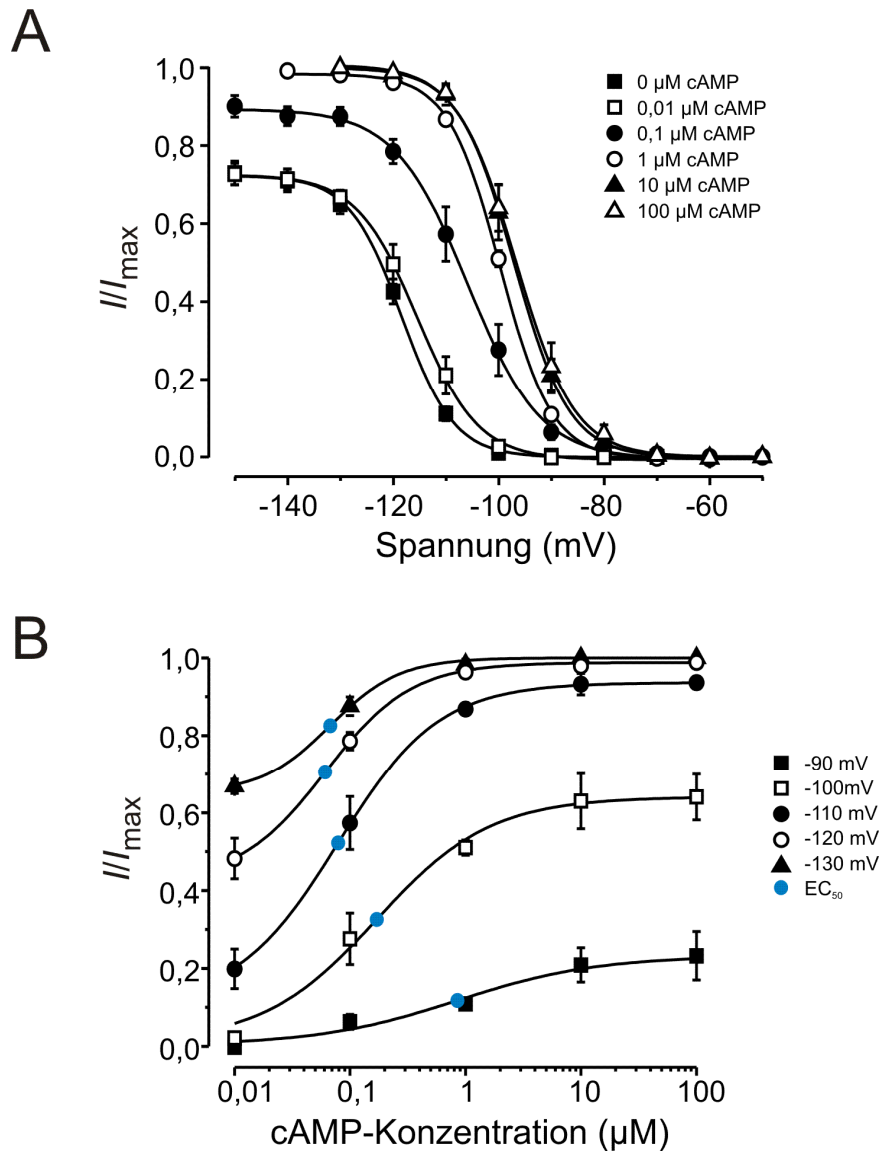


Abb. 9: Aktivierung bei unterschiedlichen cAMP-Konzentrationen bzw. Spannungen (verändert nach Kusch *et al.* 2010)

(A) *Steady-state*-Aktivierung durch Hyperpolarisation bei unterschiedlichen cAMP-Konzentrationen. (B) Dosis-Wirkungs-Kurve für cAMP bei unterschiedlichen Membranspannungen ($n = 7$ bis 24).

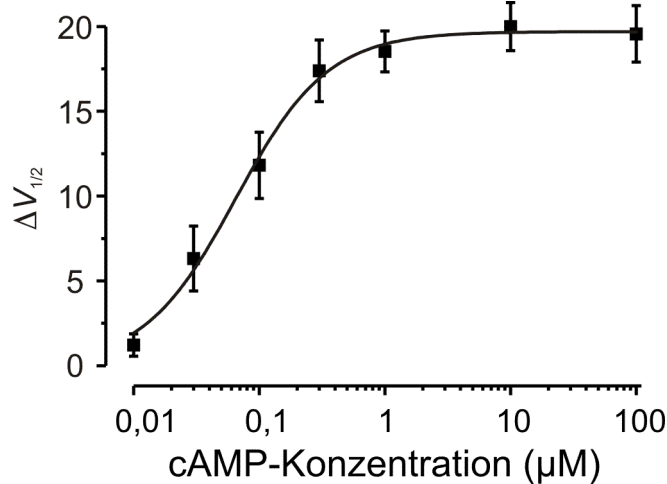
Tabelle 1: $V_{1/2}$ und effektive *Gating*-Ladung bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen

cAMP-Konzentration (μM)	0	0,01	0,1	1	10	100
$V_{1/2}$ (mV)	-118,4	-116,0	-105,8	-99,7	-97,1	-96,7
$z\delta$	5,15	4,37	3,71	5,21	4,88	4,61

Tabelle 2: EC_{50} und H bei verschiedenen Membranspannungen

Membranspannung (mV)	-90	-100	-110	-120	-130
EC_{50} (μM)	0,85	0,17	0,08	0,06	0,07
Hill-Koeffizient	0,71	0,88	0,99	1,16	1,45

Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für die cAMP-abhängige Verschiebung der *Steady-state*-Aktivierung, quantifiziert als Verschiebung von $V_{1/2}$, bezogen auf $V_{1/2}$ ohne cAMP ($\Delta V_{1/2}$), ist in Abb. 10 dargestellt. Die Punkte wurden mittels einer Hill-Funktion beschrieben (Gleichung 2). Danach betrug die Ligandenkonzentration des halbmaximalen Effektes $0,065 \mu\text{M}$ cAMP und die maximale, durch cAMP hervorgerufene Verschiebung der Aktivierungskurve $19,7 \text{ mV}$.

**Abb. 10: Verschiebung der *Steady-state*-Aktivierung**

Verschiebung der Aktivierungskurve durch verschiedenen cAMP-Konzentrationen im Vergleich zur Aktivierung ohne cAMP ($n = 7$ bis 10).

Die Aktivierung der Kanäle wurde nach einer initialen Verzögerung monoexponentiell beschrieben (Gleichung 3). Die Beschleunigung der Aktivierungskinetik durch cAMP und Membranspannung wird in Abb. 11 deutlich.

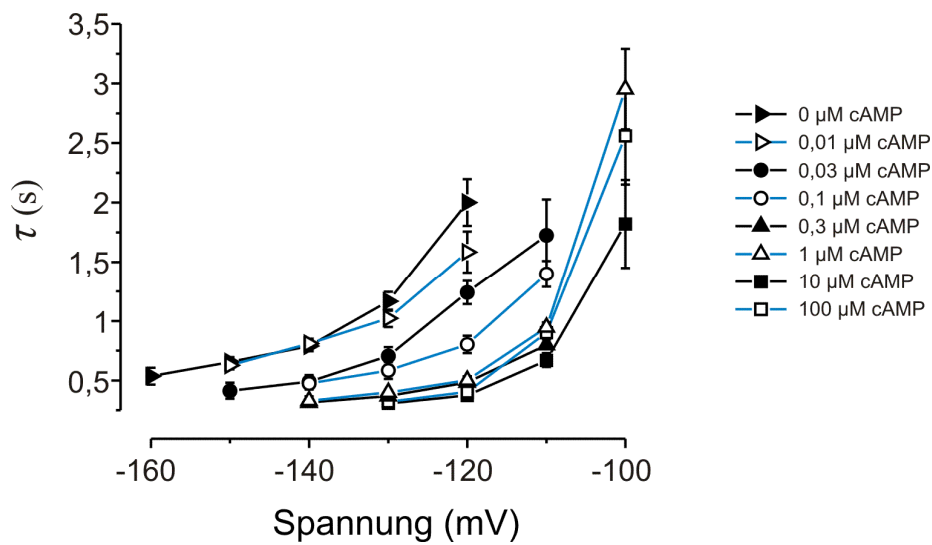


Abb. 11: Aktivierungsgeschwindigkeit der HCN2-Kanäle

Die monoexponentielle Beschreibung erfolgte bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Membranspannung ($n = 4$ bis 28).

Bei gleicher Membranspannung aktivieren HCN2-Kanäle in Gegenwart von cAMP bis zu fünf mal schneller als in Abwesenheit von cAMP. Konzentrationen über $0,3 \mu\text{M}$ cAMP bewirken jedoch keine weitere Erhöhung der Aktivierungsgeschwindigkeit.

5.2 cAMP-Sprünge bei verschiedenen Spannungen

5.2.1 Aktivierung

Die ligandenabhängige Aktivierung wurde getrennt von der spannungsabhängigen Aktivierung untersucht (Abb. 12).

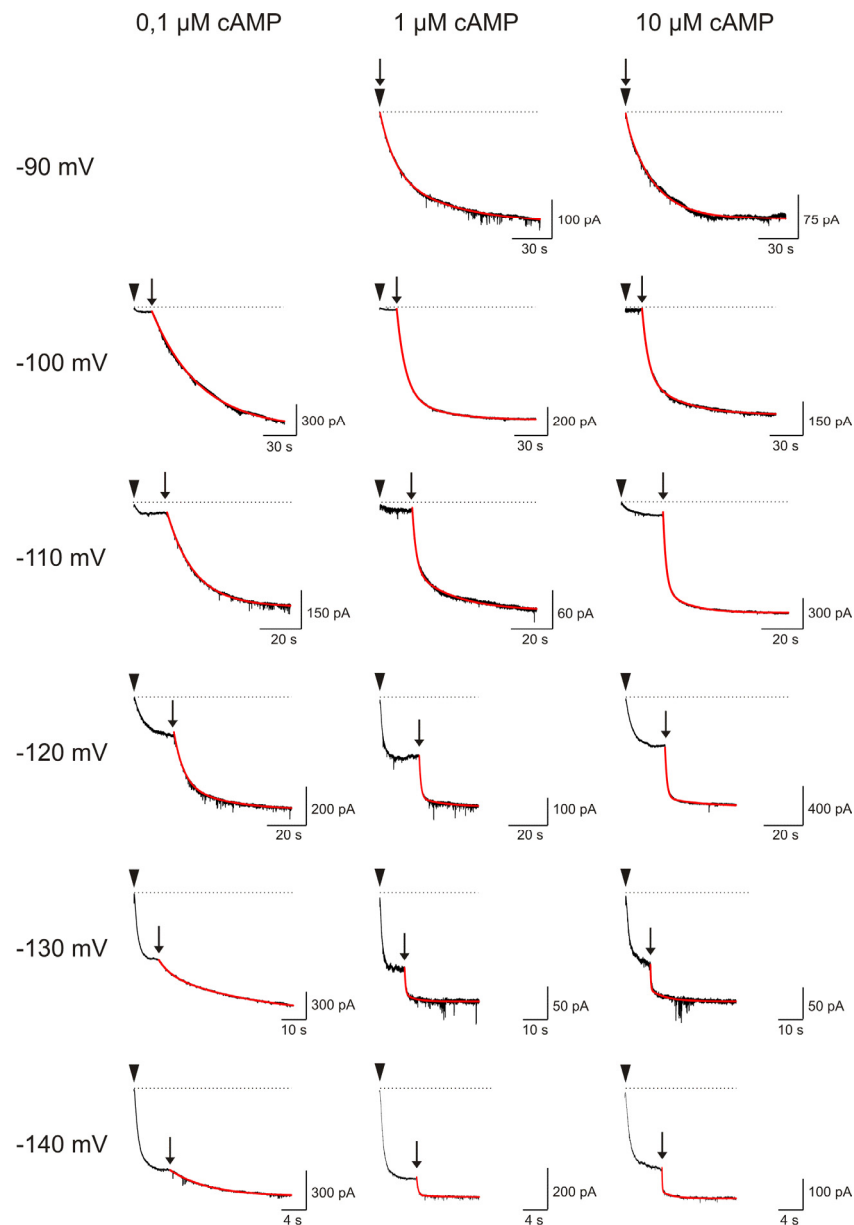


Abb. 12: Beispielstromspuren für die Aktivierung durch schnelle cAMP-Zugabe

Nach einer Aktivierung von -30 mV auf die angegebene Spannung (Dreieck) folgte ein cAMP-Sprung von null auf eine konstante Konzentration (Pfeil). Die roten Spuren zeigen die angepassten Kurven.

Dabei wurde nach einer Aktivierung durch einen Spannungssprung die Aktivierung durch cAMP beobachtet, indem ein schneller Lösungswechsel von null auf eine konstante cAMP-Konzentration durchgeführt wurde.

Die ligandeninduzierte Aktivierung zeigte keine Sigmoidität. Sie konnte teilweise monoexponentiell ($0,1 \mu\text{M}$ cAMP; -90 mV) beschrieben werden. Von -100 mV bis -140 mV erforderten die Aktivierungen bei $1 \mu\text{M}$ cAMP und $10 \mu\text{M}$ cAMP eine biexponentielle Beschreibung (Abb. 13).

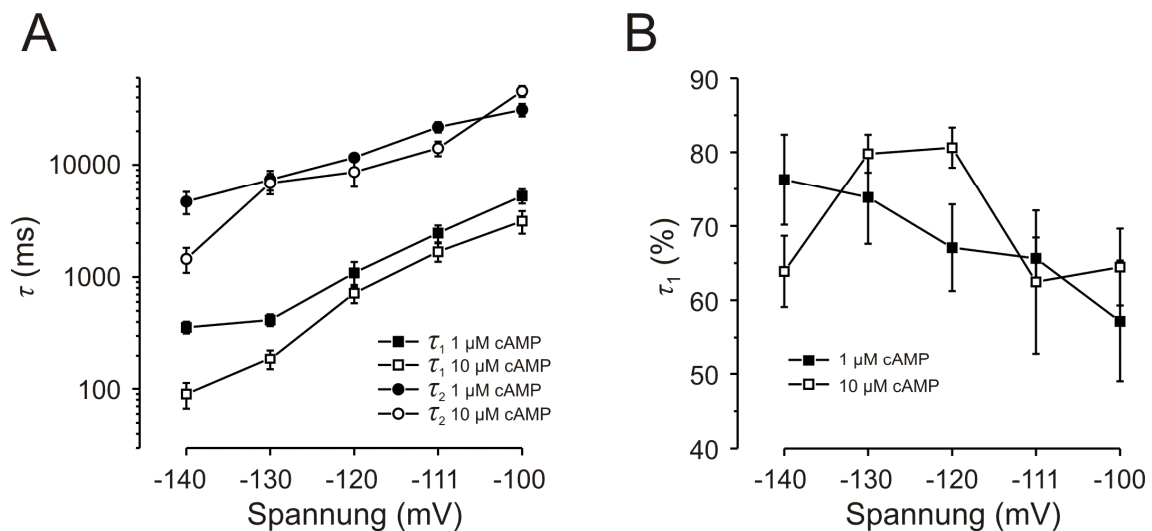


Abb. 13: Ligandeninduzierte Aktivierung mit biexponentiellem Verlauf bei verschiedenen Spannungen

(A) Grafische Darstellung der schnellen (τ_1) und langsamen (τ_2) Aktivierungszeitkonstanten. (B) Anteil der schnellen Aktivierungszeitkonstanten τ_1 an der Gesamtaktivierung ($n = 6$ bis 9).

Alle Zeitkonstanten in Abb. 13A, mit Ausnahme der langsamen Aktivierungszeitkonstante τ_2 bei -100 mV , zeigten bei der geringeren cAMP-Konzentration sowie bei weniger negativen Spannungen eine langsamere Aktivierung. Der Anteil, den die schnell aktivierende Komponente τ_1 am Gesamtstrom aufweist, ist in Abb. 13B dargestellt. Dieser schwankt zwischen den Konzentrationen und Spannungen von 57 bis 80%. Es ist keine Abhängigkeit des Verhältnisses von τ_1 zu τ_2 zur cAMP-Konzentration oder der Membranspannung erkennbar.

Zur besseren Vergleichbarkeit der biexponentiell beschreibbaren Aktivierungskinetiken mit den monoexponentiell beschreibbaren Zeitverläufen wurde für die biexponentiellen Verläufe die mittlere Zeitkonstante τ_{mittel} mit Gleichung 5 berechnet. In Abb. 14 sind die

gemittelten Zeitkonstanten und die monoexponentiell ermittelten Aktivierungszeitkonstanten aufgetragen.

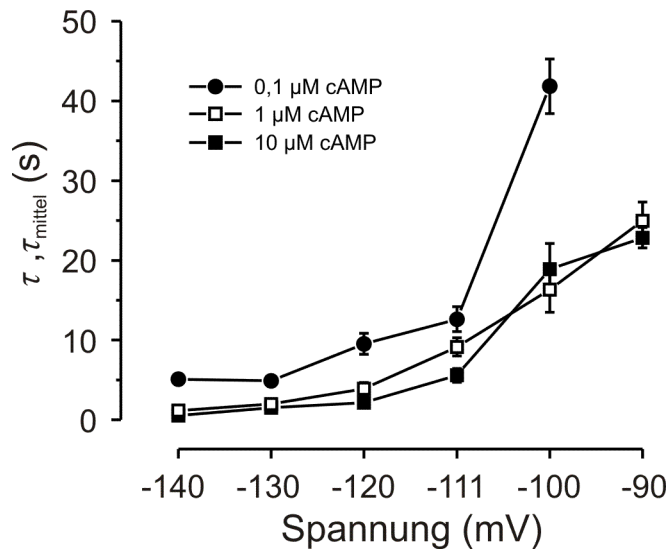


Abb. 14: Aktivierungszeitkonstanten bei verschiedenen Spannungen und cAMP-Konzentrationen

Bei einem biexponentiellen Verlauf der Aktivierung wurde aus den Aktivierungszeitkonstanten eine mittlere Zeitkonstante mit Gleichung 5 errechnet ($n = 6$ bis 9).

Die Aktivierungsgeschwindigkeit ist bei negativeren Membranspannungen deutlich beschleunigt. Die cAMP-abhängige Aktivierung durch $0,1 \mu\text{M}$ cAMP ist langsamer als bei den anderen getesteten Konzentrationen, wobei bei $1 \mu\text{M}$ cAMP ist die Aktivierungsgeschwindigkeit schon nahezu maximal ist.

5.2.2 Deaktivierung

Nach dem Anspülen der cAMP-Lösung bei verschiedenen Membranspannungen für eine bestimmte Zeit wurden Sprünge auf null cAMP ausgelöst. Beispiele für Stromspuren mit Aktivierung durch $10 \mu\text{M}$ cAMP und Deaktivierung nach cAMP-Entzug sind in Abb. 15 zu sehen.

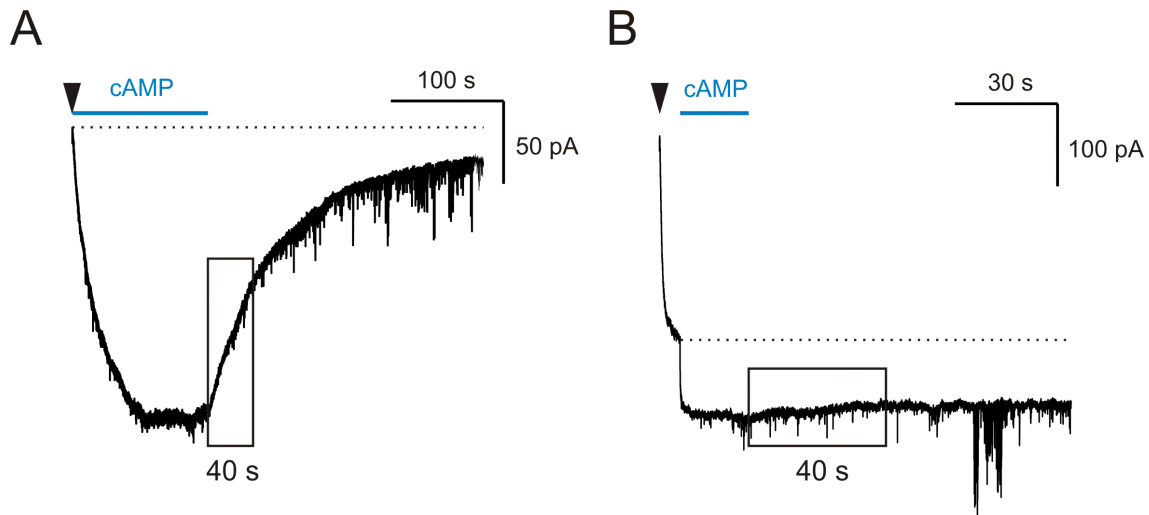


Abb. 15: Stromspuren der Aktivierung und Deaktivierung bei Zugabe und Auswaschen von 10 μ M cAMP

(A) Stromspur bei -90 mV (B) Stromspur bei -140 mV. Das Dreieck gibt jeweils den Zeitpunkt der Spannungsaktivierung an. Unter der gepunkteten Linie beginnt der cAMP-abhängige Teil des Stroms.

Bei -90 mV erfolgt eine deutliche, wenn auch langsame Deaktivierung des cAMP-abhängigen Stromes (Abb. 15A) während bei -140 mV fast keine Deaktivierung zu beobachten ist (Abb. 15B). In Abb. 16 sind repräsentative Stromspuren bei den verschiedenen Membranspannungen und cAMP-Konzentrationen abgebildet. Mit Ausnahme der Messungen bei -90 mV, wo der Abfall des Stromes monoexponentiell beschrieben werden kann, fällt die Stromamplitude bei allen anderen Spannungen mit einer nahezu linearen Kinetik ab. Die verschiedenen cAMP-Konzentrationen scheinen keine Auswirkung auf diese langsame Deaktivierung zu haben. Nur bei -90 mV Membranspannung ist ein erheblicher Abfall der Stromamplitude erkennbar. Zur Verdeutlichung ist in Abb. 17 die mittlere Deaktivierung des cAMP-abhängigen Stromes 40 Sekunden nach dem Wechsel auf cAMP-freie Lösung in Abhängigkeit von der Spannung aufgetragen.

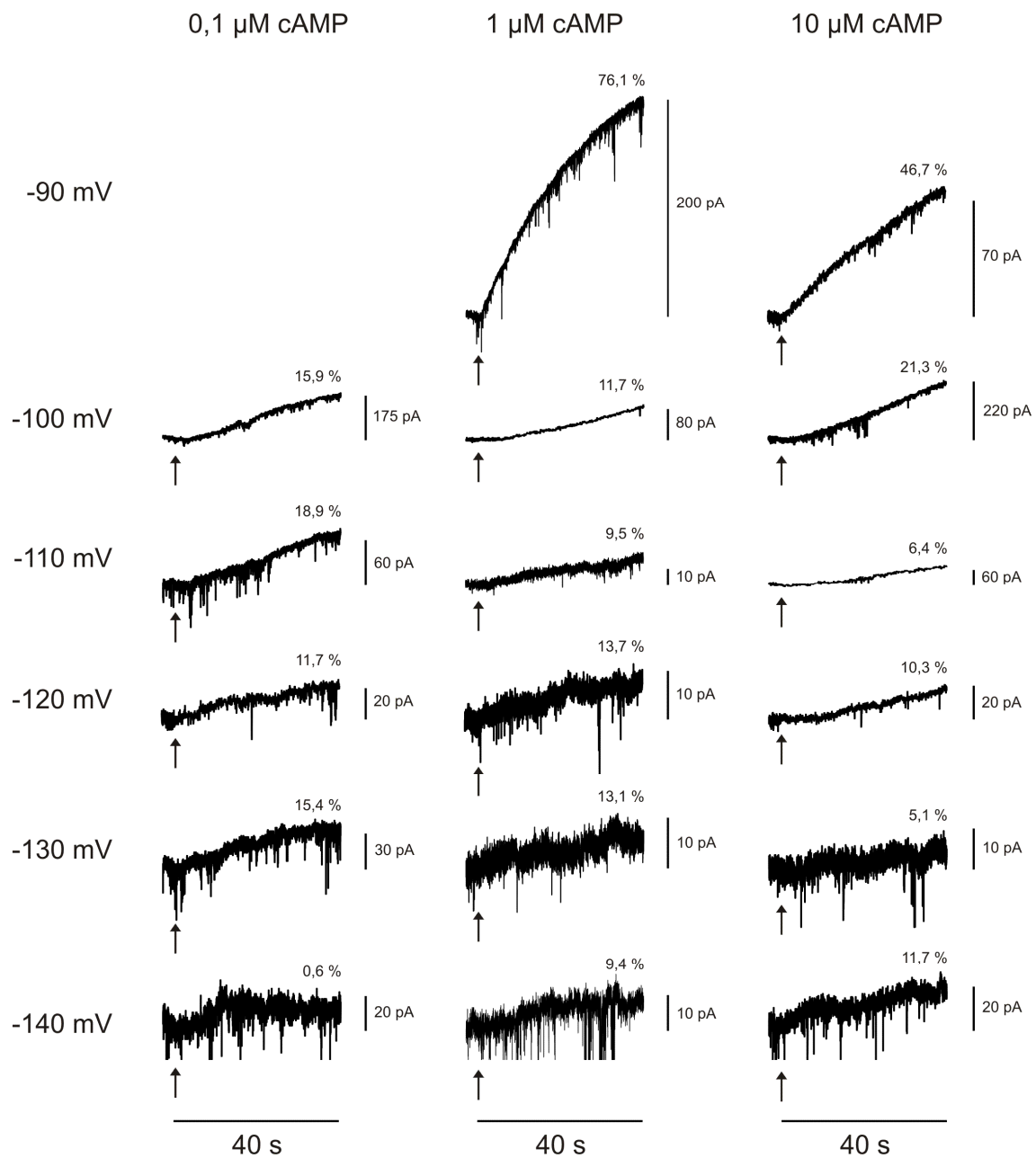


Abb. 16: Stromspuren Zeigen die Deaktivierung der HCN2-Kanäle über 40 Sekunden nach einem Wechsel zu cAMP-freier Lösung an

Die Pfeile geben den Zeitpunkt des schnellen Lösungswechsels auf cAMP-freie Badlösung an. Der Abfall der cAMP-abhängigen Komponente der Stromamplitude 40 Sekunden nach cAMP-Entzug ist jeweils in Prozent angegeben.

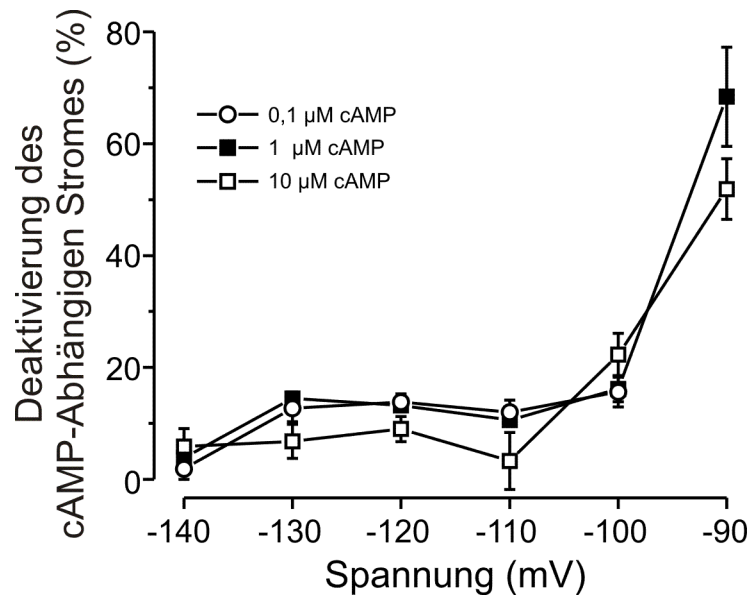


Abb. 17: Deaktivierung des cAMP-abhängigen Stromes bei verschiedenen Aktivierungsgraden

Die mittlere prozentuale Deaktivierung des cAMP-abhängigen Stromes 40 Sekunden nach Entzug der cAMP-Lösung steigt bei weniger negativen Spannungen deutlich an ($n = 3$ bis 8).

Zwischen den verschiedenen cAMP-Konzentrationen gab es keinen signifikanten Unterschied im Abfall der cAMP-abhängigen Komponente vom Gesamtstrom 40 Sekunden nach cAMP-Entzug. Bei -90 mV, einer Spannung bei welcher ohne cAMP keine Aktivierung beobachtet wird, zeigt die prozentuale Deaktivierung nach 40 Sekunden signifikante Unterschiede zu allen weiteren gemessenen Membranspannungen ($p < 0,01$).

5.3 Kanalaktivierung und Bindung des fluoreszierenden Liganden fcAMP

5.3.1 Vergleich von fcAMP und cAMP

Für das weitere Verständnis der Ergebnisse ist es nützlich, einige Daten darzustellen, die aus einer Publikation der Arbeitsgruppe stammen und von Dr. Jana Kusch gemessen wurden (siehe Abb. 18, 22 und 23). Der fluoreszierende Ligand fcAMP moduliert HCN2-Kanäle in ähnlicher Weise wie cAMP (Abb. 18). Auch durch fcAMP kann der Maximalstrom erreicht werden, und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wird zu positiveren Spannungen verschoben. Mittels einer modifizierten Boltzmann-Gleichung (Gleichung 1) wurden die halbmaximalen Spannungen $V_{1/2, \text{fcAMP}} = -111,0$ mV und $V_{1/2, \text{cAMP}} = -104,4$ mV für die sättigende Konzentration von $7,5 \mu\text{M}$ ermittelt.

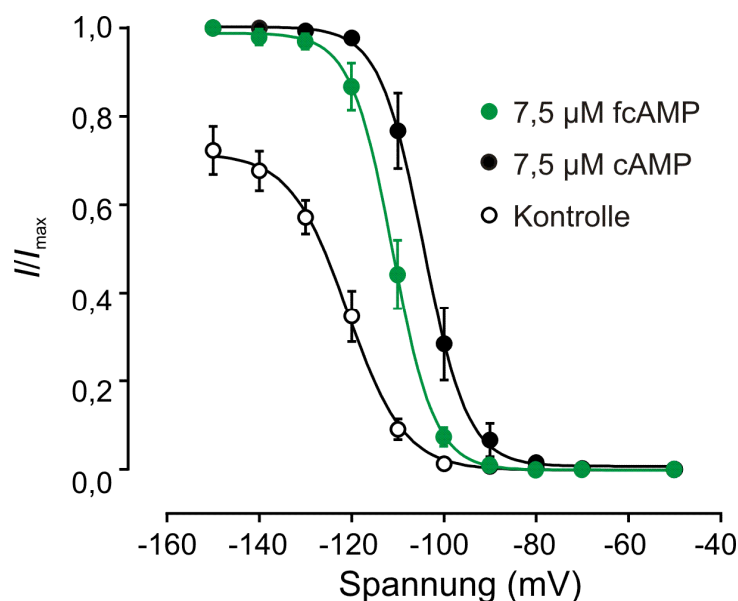


Abb. 18: Vergleich der *Steady-state*-Aktivierung (verändert nach Kusch *et al.* 2010)

Aktivierung bei sättigenden Konzentrationen von fcAMP und cAMP im Vergleich mit der Aktivierungskurve ohne Ligand ($n = 6$ bis 9).

Dann wurden die Effekte der beiden Liganden nach einer spannungsinduzierten Aktivierung auf -130 mV bei verschiedenen Konzentrationen verglichen (Abb. 19).

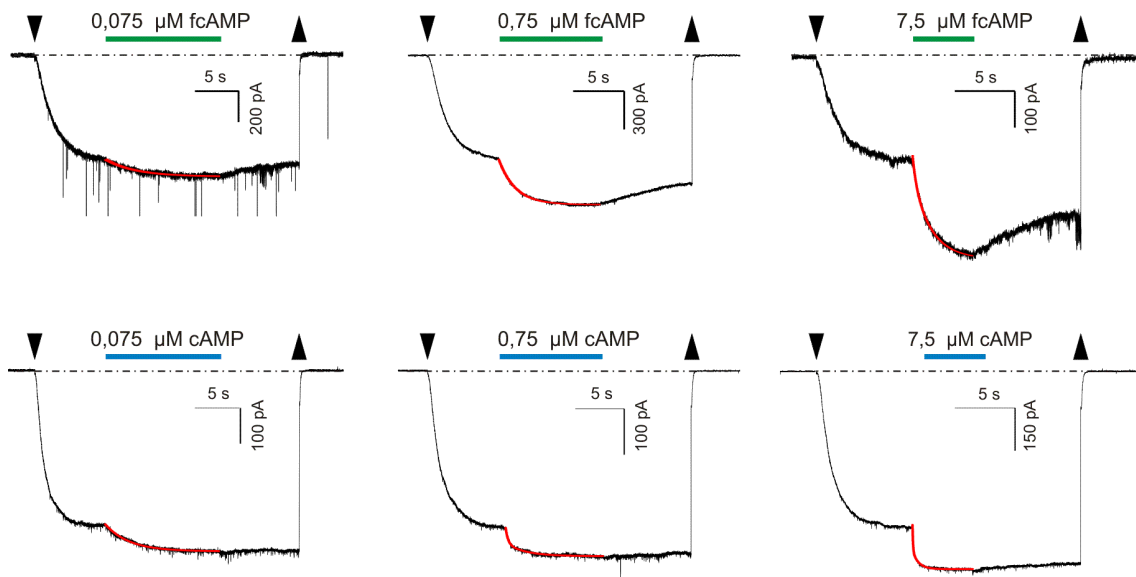


Abb. 19: Beispiele für Stromspuren der Aktivierung durch Sprünge der Ligandenkonzentration nach vorheriger Spannungsaktivierung bei -130 mV

Zugabe und Auswaschen von *fcAMP* (grüner Balken) und *cAMP* (blauer Balken). Das abwärts gerichtete Dreieck zeigt den Spannungssprung von -30 mV auf -130 mV an und das aufwärtsgerichtete Dreieck den Spannungssprung von -130 mV zurück auf -30 mV. Die roten Spuren zeigen die Approximationen der Aktivierungen.

Bei einer nahezu sättigenden Spannung von -130 mV zeigte die Aktivierung bei 0,75 und 7,5 μM *cAMP* einen biexponentiellen Verlauf, während die Aktivierung durch *fcAMP* sowie durch 0,075 μM *cAMP* monoexponentiell zu beschreiben war (Abb. 20A). Die Geschwindigkeit der Aktivierung steigt jeweils mit der Ligandenkonzentration. Um die Aktivierungsgeschwindigkeiten besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Zeit, die zwischen dem Erreichen von 10% des Maximalstromes bis 90% des Maximalstromes vergeht (t_{10-90}), bestimmt (Abb. 20B).

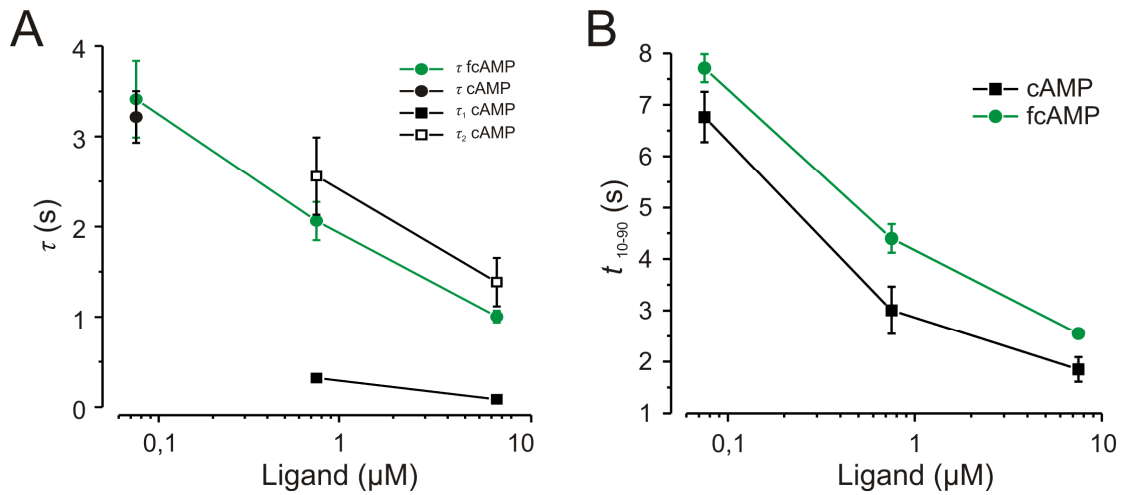


Abb. 20: Vergleich der Aktivierungszeitkonstanten durch cAMP und fcAMP

(A) Aktivierungszeitkonstanten für die monoexponentielle (τ) und biexponentielle Beschreibung (τ_1 , τ_2) als Funktion der Ligandenkonzentration ($n = 6$ bis 11). (B) t_{10-90} als Funktion der Ligandenkonzentration ($n = 5$ bis 10, verändert nach Kusch *et al.* 2011).

Die Aktivierung der Kanäle nach fcAMP-Zugabe ist etwas langsamer als die cAMP-induzierte Aktivierung.

Die Deaktivierung der fcAMP-abhängigen Stromkomponente nach Ligandenentzug ist deutlich schneller als die Deaktivierung nach cAMP-Entzug (Abb. 21).

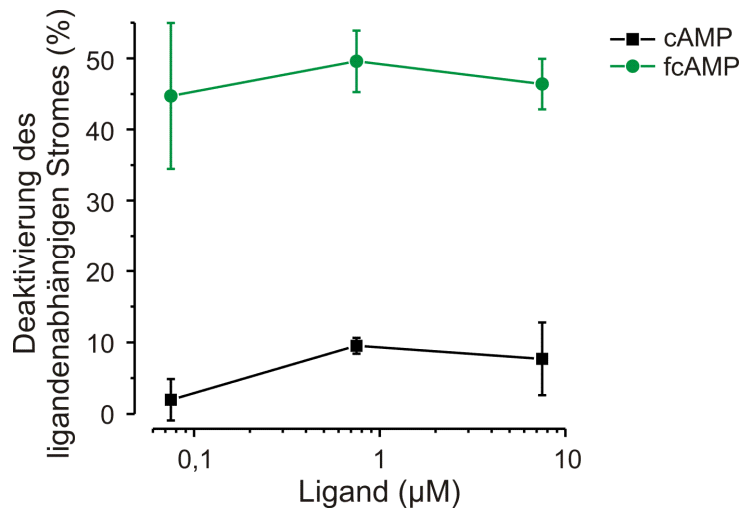


Abb. 21: Deaktivierung des ligandenabhängigen Stromes

Deaktivierung neun Sekunden nach Entzug der cAMP oder fcAMP-Konzentrationen bei -130 mV ($n = 4$ bis 9).

Neun Sekunden nach fcAMP-Entzug hatte sich die Amplitude um fast die Hälfte des fcAMP-abhängigen Stromes verringert, während diese nach cAMP-Entzug nur um 2% bis 10% des cAMP-abhängigen Stromes zurückging.

5.3.2 fcAMP-Bindung bei Kanalaktivierung

Bei ständiger Präsenz des fluoreszierenden Liganden fcAMP konnte durch spannungsinduzierte Aktivierung der Kanäle ein Fluoreszenzanstieg beobachtet werden. In Abb. 22 ist zu sehen, wie die Bindung des fluoreszierenden Liganden fcAMP mit der Aktivierung der Kanäle zunimmt. In Kontrollen mit Patches ohne HCN2-Kanäle konnte dieser Anstieg bei kontinuierlicher fcAMP-Zugabe nicht beobachtet werden.

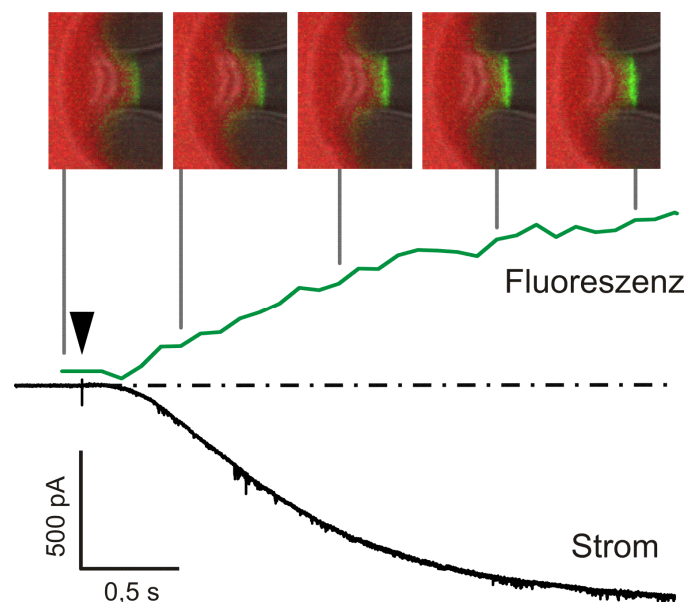


Abb. 22: Zunahme der fcAMP-Bindung während einer spannungsinduzierten Kanalaktivierung (verändert nach Kusch *et al.* 2010)

Das Dreieck zeigt den Zeitpunkt der Kanalaktivierung durch einen Spannungssprung von -30 auf -130 mV. Die eingefügten Bilder zeigen eine Überlagerung der grünen Fluoreszenz mit der roten Fluoreszenz und dem Transmissionsbild zu dem angegebenen Zeitpunkt.

Die normierte Fluoreszenz (F/F_{\max}) erhöht sich mit steigender fcAMP-Konzentration und steigt bei stärkerer Spannungsaktivierung der Kanäle (Abb. 23). Ein Maximalwert wird bei 15 μM fcAMP und -130 mV erreicht.

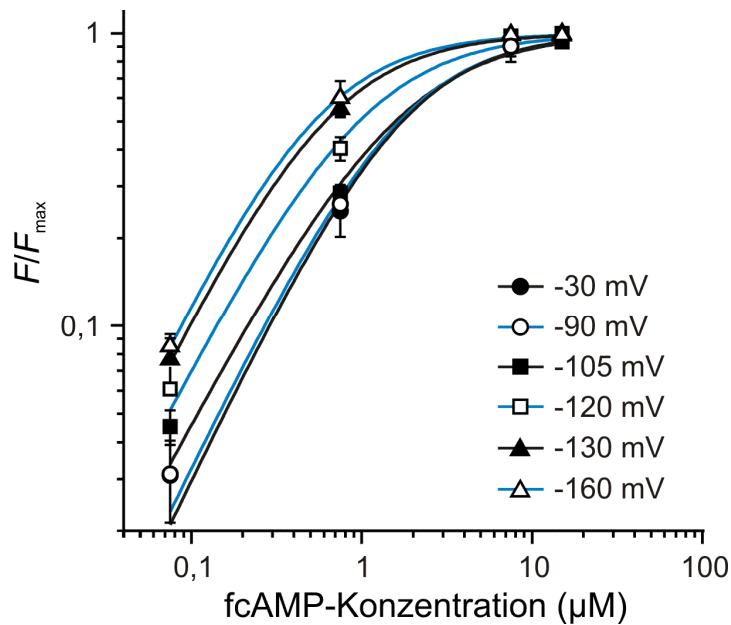


Abb. 23: Bindung von fcAMP unter *Steady-state*-Bedingungen (verändert nach Kusch *et al.* 2010)

Das Diagramm zeigt die fcAMP-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration bei verschiedenen Membranspannungen.

5.3.3 fcAMP-Bindung und -Dissoziation bei Konzentrationssprüngen an aktivierten und nicht aktivierten Kanälen

Um den Zeitverlauf der Aktivierung bei einem Konzentrationssprung von der spannungsinduzierten Aktivierung zu trennen, wurden zunächst ein Spannungssprung auf -130 mV appliziert und dann, nach Erreichen eines Gleichgewichts, der fcAMP-Sprung auf eine definierte Konzentration und zurück auf null. Neun Sekunden nach Beginn des Auswaschens wurde die Spannungsaktivierung beendet. Danach erfolgten entsprechend Zugabe und Auswaschen des Liganden ohne Aktivierung durch Spannung bei -30 mV.

Diese Messungen wurden mit sättigender fcAMP-Konzentration (7,5 µM fcAMP), einer in etwa halbsättigenden Konzentration (0,75 µM fcAMP) und einer geringen fcAMP-Konzentration (0,075 µM) durchgeführt (Abb. 24). Bei einer maximalen Fluoreszenz, welche nicht durch höhere fcAMP-Konzentrationen gesteigert werden kann, kann man erwarten, dass je ein fcAMP-Molekül pro Untereinheit gebunden ist. Das heißt, dass vier fcAMP-Moleküle pro Kanal gebunden sind. Wie viele Moleküle fcAMP im Mittel

pro Kanal gebunden sind zeigt die NL-Skala an. So sind bei Sättigung ($7,5 \mu\text{M}$ fcAMP) 4 Liganden pro Kanal gebunden und bei $0,75$ und $0,075 \mu\text{M}$ fcAMP entsprechend 2,2 und 0,3 Liganden.

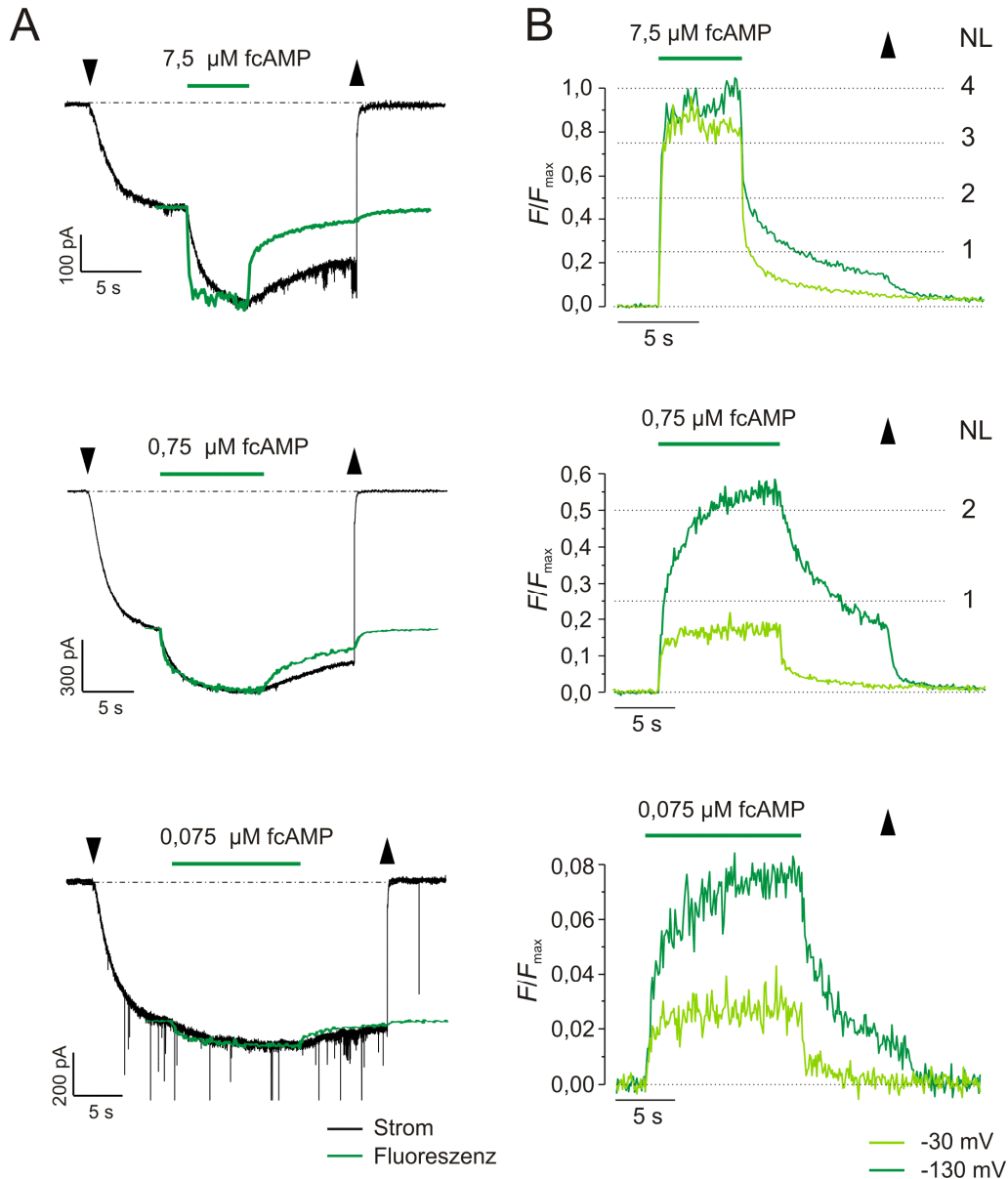


Abb. 24: Beispielmessungen bei verschiedenen fcAMP-Konzentrationen

(A) Stromspuren (schwarz) und Fluoreszenzspuren (grün) bei Zugabe von fcAMP (grüner Balken). Das abwärtsgerichtete Dreieck zeigt den Spannungssprung von -30 mV auf -130 mV und das aufwärtsgerichtete Dreieck den Spannungssprung von -130 mV zurück auf -30 mV an. Das Fluoreszenzsignal wurde zur Veranschaulichung invertiert und auf die Amplitude der Stromänderung skaliert. (B) Vergleich der Fluoreszenzsignale von aktivierten Kanälen (-130 mV , dunkelgrün) und nicht aktivierten Kanälen (-30 mV , hellgrün) im selben Patch. Die gepunkteten Linien geben die Anzahl der im Mittel gebundenen Liganden an (NL-Skala).

Nach der Bindung des fluoreszierenden Liganden erfolgte seine Abspaltung nach dem Auswaschen (Abb. 24A). Diese Dissoziation wird durch die spannungsabhängige Deaktivierung der Kanäle stark beschleunigt (Dreieck in Abb. 24B). In Abb. 24B ist auch ein deutlicher Unterschied zwischen der Bindung und der Dissoziation des fluoreszierenden Liganden bei aktivierten Kanälen und nichtaktivierten Kanälen zu sehen. Bei nichtaktivierten Kanälen ist die Bindung (F/F_{\max}) geringer als bei Kanalaktivierung. Die jeweiligen Zeitkonstanten der Fluoreszenzen und des Stromes wurden mit Gleichung 3 sowie mit Gleichung 4 und 5 beim Fluoreszenzabfall bei -130 mV ermittelt. Sie sind in Abb. 25 aufgetragen.

Bei deaktivierten Kanälen erfolgt der gesamte Bindungsvorgang von fcAMP auf den jeweiligen Maximalwert schneller als bei aktivierten Kanälen (Abb. 25A), dabei ist jedoch die geringere Maximalbindung zu beachten. Die Bindungskinetik ist darüber hinaus von der fcAMP-Konzentration abhängig, denn je niedriger die Ligandenkonzentration wird, desto langsamer ist die Ligandenbindung. Insgesamt verläuft die Bindung schneller als die dazugehörige Kanalaktivierung, hängt aber von der fcAMP-Konzentration in ähnlicher Weise ab. Auch die Dissoziation ist bei deaktivierten Kanälen schneller als bei aktivierten Kanälen (Abb. 25B). Eine Beschleunigung liegt aber nur bei -30 mV vor. Bei Kanalaktivierung (-130 mV) ist die Dissoziation bei der mittleren Ligandenkonzentration von $0,75 \mu\text{M}$ fcAMP am langsamsten.

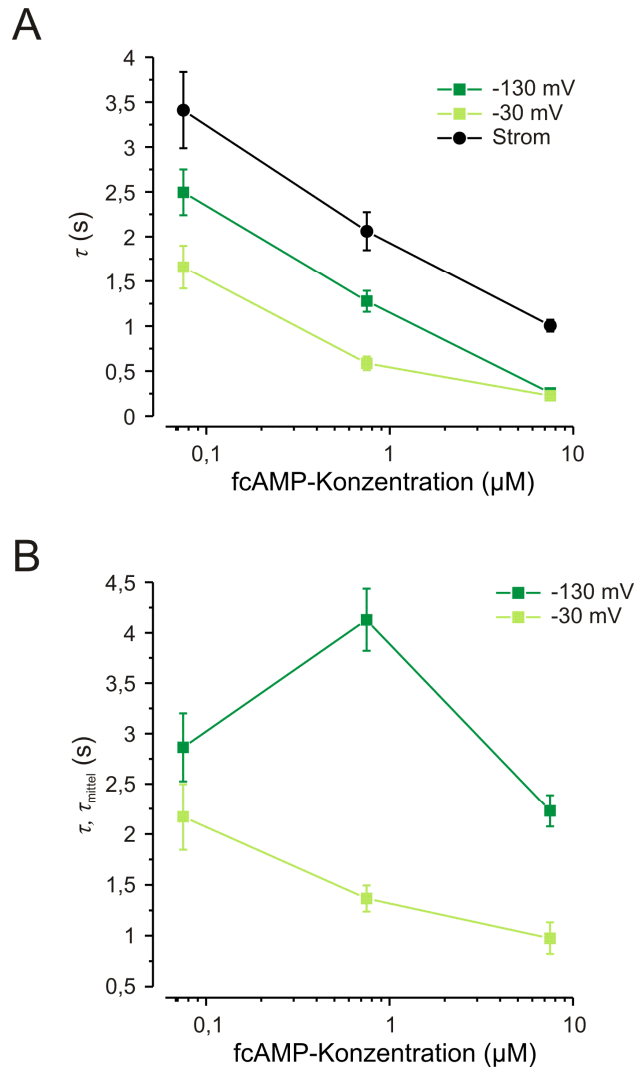


Abb. 25: Bindung und Dissoziation von fcAMP bei verschiedenen Konzentrationen

(A) Zeitkonstante τ des Fluoreszenzanstiegs bei -130 mV (dunkelgrün) und -30 mV (hellgrün) bei fcAMP-Zugabe verglichen mit der Aktivierungsgeschwindigkeit der fcAMP-bedingten Kanalaktivierung (schwarz). (B) Zeitkonstante τ_{mittel} des Fluoreszenzabfalls bei -130 mV (dunkelgrün) und Zeitkonstante τ des Fluoreszenzabfalls bei -30 mV (hellgrün) bei fcAMP-Entzug ($n = 6$ bis 12).

In Abb. 26 sind die Verläufe der mittleren Fluoreszenzen der drei gemessenen fcAMP-Konzentrationen bei -130 mV mit den skalierten gemittelten Stromspuren überlagert. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung in der Kinetik des langsamen Teils der Bindung und der Aktivierung sowie des langsamen Teils der Dissoziation und der Deaktivierung, während die schnelle anfängliche Bindung keine Korrelation zur Kanalaktivierung zeigt.

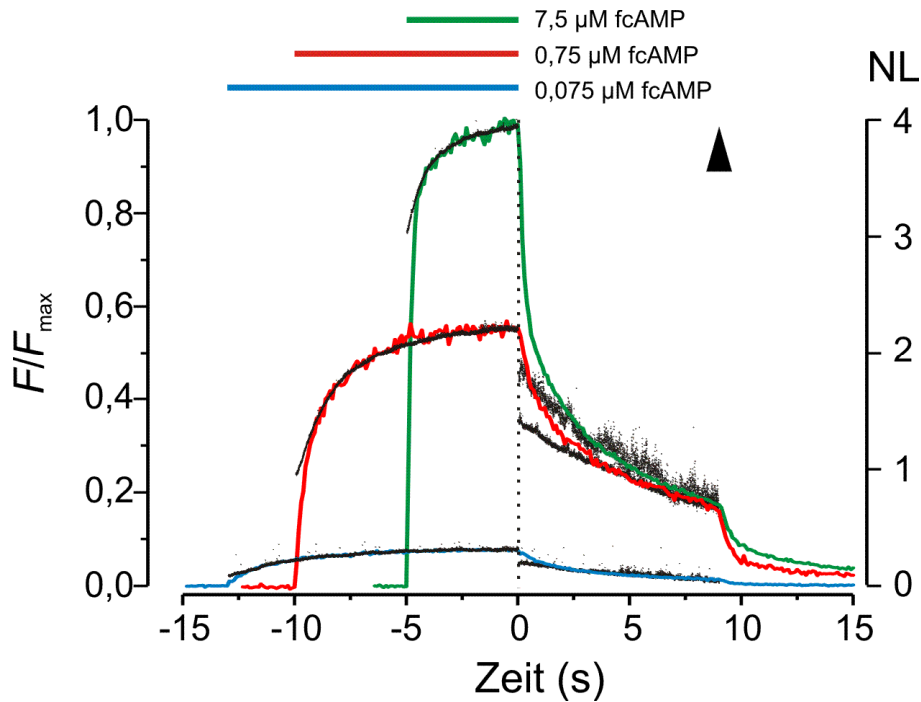


Abb. 26: Zeitverläufe der mittleren Fluoreszenzen überlagert mit den gemittelten Stromspuren der fcAMP-vermittelten Aktivierung bei -130 mV (verändert nach Kusch *et al.* 2011)

Die Amplitude der gemittelten Stromspuren (schwarz, $n = 8$ bis 11) ist jeweils auf den langsamen Anstieg und Abfall der Fluoreszenzen (farbig; $n = 7$ bis 12) skaliert. Der 0-Punkt auf der X-Achse ist der Zeitpunkt des Wechsels zu fcAMP-freier Lösung. Das aufwärtsgerichtete Dreieck zeigt einen Spannungssprung von -130 mV auf -30 mV.

Legt man die Zeitverläufe der fcAMP-Dissoziation von 0,75 μM fcAMP und 7,5 μM fcAMP übereinander, und setzt man den Beginn der Dissoziation der geringeren fcAMP-Konzentration etwa 840 ms nach dem Beginn der Dissoziation der höheren, erhält man nach etwa 600 ms einen nahezu identischen Verlauf des Fluoreszenzabfalls (Abb. 27).

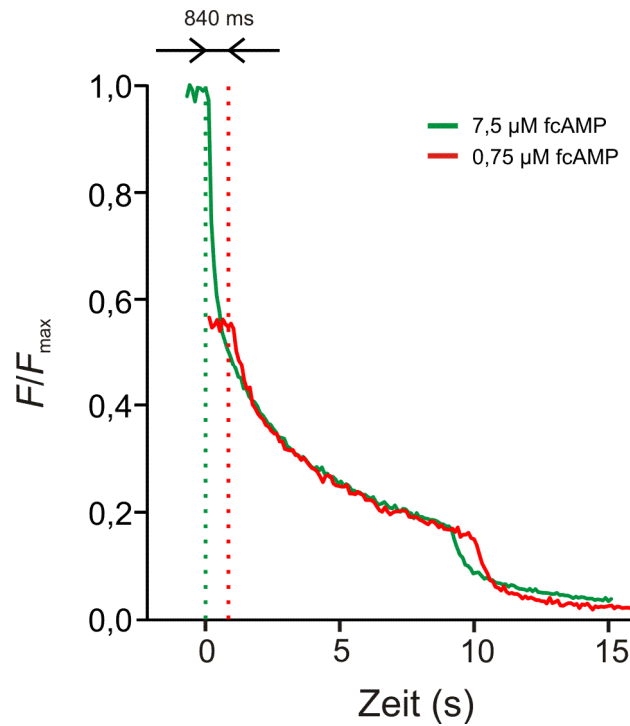


Abb. 27: Zeitversatz der Verläufe der mittleren Fluoreszenzen bei 0,75 und 7,5 μM fcAMP und -130 mV Membranspannung (verändert nach Kusch *et al.* 2011)

Überlagerung des Verlaufes der mittleren Fluoreszenzen bei Dissoziation von 0,75 μM fcAMP mit einer Zeitverschiebung von 840 ms mit dem Verlauf der Dissoziation bei Entzug von 7,5 μM fcAMP. Die gepunkteten Linien geben jeweils den Zeitpunkt des Wechsels auf eine fcAMP-freie Lösung an.

5.4 Modellierung der Aktivierungs- und Bindungsverläufe

5.4.1 Anpassung eines Modells an die Zeitverläufe von Bindung und Aktivierung

Unter Verwendung der gemittelten Verläufe der Bindung und Dissoziation sowie der Aktivierung und Deaktivierung bei -130 mV wurde mittels einer globalen Approximation ein geeignetes Markov-Modell an die Daten angepasst (Abb. 28 und 29).

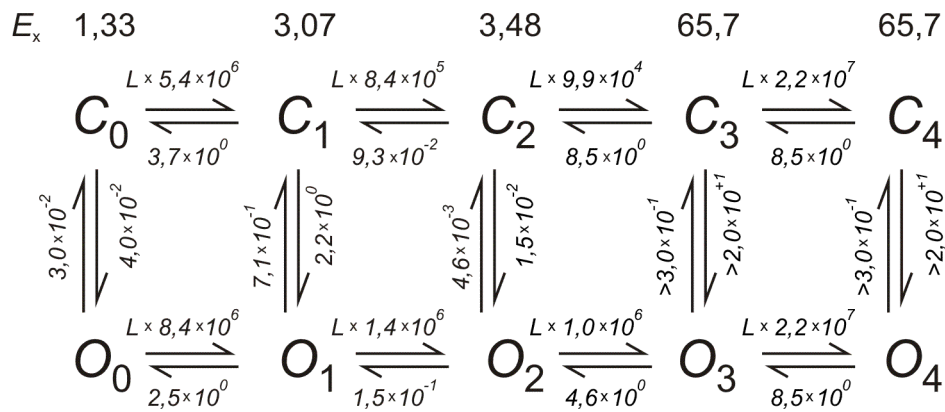


Abb. 28: Markov-Modell welches die Aktivierungs- und Bindungsverläufe am besten beschrieben konnte (verändert nach Kusch *et al.* 2011)

Markov-Modell mit vier Bindungsschritten. C_x und O_x sind die geschlossenen und offenen Zustände mit x gebundenen Liganden ($x = 0$ bis 4) und L ist die Ligandenkonzentration in M. Die Werte der Geschwindigkeitskonstanten k sind in Tabelle 3 zu sehen. Die Gleichgewichtskonstante der Offen-Geschlossen-Isomerisierung E_x berechnet sich aus $k_{\text{OXCX}}/k_{\text{CXOX}}$ ($x = 0$ bis 4).

Für eine zufriedenstellende Beschreibung waren vier Bindungsschritte notwendig, welche sowohl im geschlossenen als auch im offenen Zustand möglich sein mussten. In Abb. 28 ist ein Schema des Markov-Modells dargestellt, welches sowohl die Aktivierungsdaten (Offenwahrscheinlichkeit P_o) als auch die Fluoreszenzdaten (fcAMP-Bindung F/F_{max}) bei -130 mV akzeptabel beschreiben kann (Abb. 29).

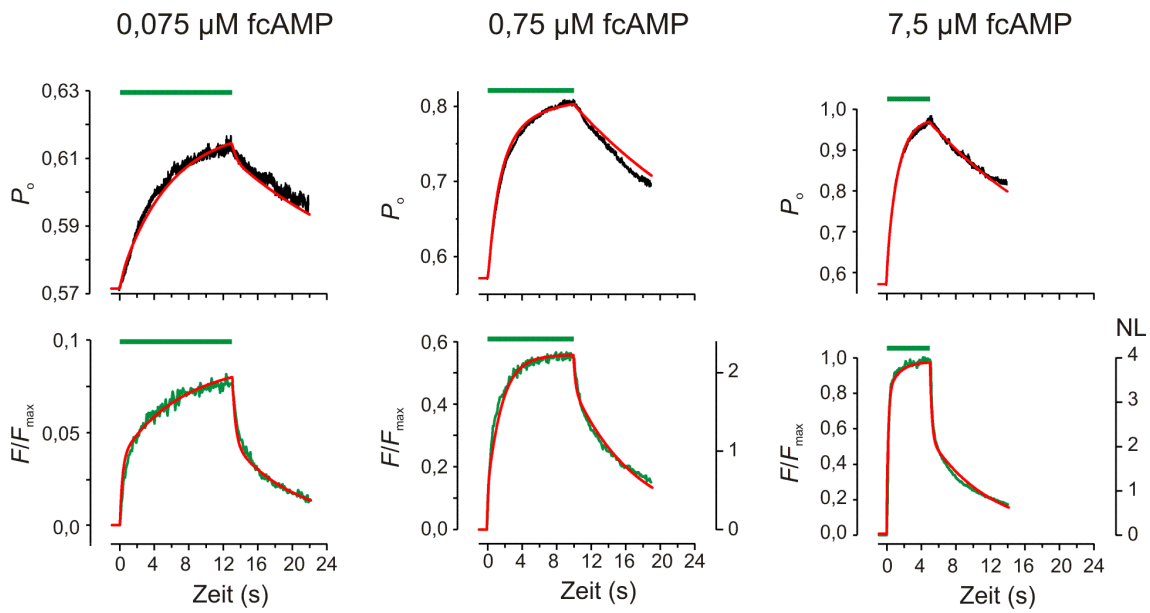


Abb. 29 Globale Approximation der Verläufe der Bindung und Aktivierung mittels eines Markov-Modells (verändert nach Kusch *et al.* 2011)

Zeitverläufe der mittleren Fluoreszenzen (grün) und Offenwahrscheinlichkeiten (schwarz) beim An- und Auswaschen von 3 verschiedenen fcAMP-Konzentrationen bei -130 mV Membran-spannung. Die roten Linien zeigen die globale Approximation der Zeitverläufe mit dem in Abb. 28 gezeigten Markov-Modell. Die grünen Balken geben die Applikation der entsprechenden fcAMP-Lösung an.

Die durch das Modell erhaltenen Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten sind in Tabelle 3 gelistet. Die komplexen mathematischen Analysen wurden von Prof. Dr. Eckhard Schulz, Schmalkalden, durchgeführt. Einige Geschwindigkeitskonstanten mussten gleichgesetzt werden ($k_{C3C4} = k_{O3O4}$; $k_{C3C2} = k_{C4C3} = k_{O4O3}$; $k_{O4C4} = k_{O3C3}$) um Konvergenz zu erhalten. Von den 16 freien Parametern wurden 15 bestimmt. Lediglich $k_{O4C4} = k_{O3C3}$ war nicht bestimmt. Für die Parameter wurde eine untere Schranke ermittelt, indem bei der Fixierung aller anderen Parameter eine Abweichung des χ^2 von 10% angenommen wurde.

Tabelle 3: Parameter aus globalem Fit mittels Markov-Modell aus Abb. 28

Parameter	Einheit	Betrag	SEM
$k_{C_0C_1}$	$s^{-1}M^{-1}$	5,4E+6	4,2E+5
$k_{C_1C_2}$	$s^{-1}M^{-1}$	8,4E+5	3,9E+4
$k_{C_2C_3}$	$s^{-1}M^{-1}$	9,9E+4	1,6E+3
$k_{C_3C_4}=k_{O_3O_4}$	$s^{-1}M^{-1}$	2,2E+7	3,2E+6
$k_{C_1C_0}$	s^{-1}	3,7E+0	3,1E-1
$k_{C_2C_1}$	s^{-1}	9,3E-2	4,3E-3
$k_{C_3C_2}=k_{C_4C_3}=k_{O_4O_3}$	s^{-1}	8,5E+0	5,2E-1
$k_{O_0O_1}$	$s^{-1}M^{-1}$	8,4E+6	5,4E+5
$k_{O_1O_2}$	$s^{-1}M^{-1}$	1,4E+6	3,6E+4
$k_{O_2O_3}$	$s^{-1}M^{-1}$	1,0E+6	9,2E+4
$k_{O_0C_0}$	s^{-1}	3,0E-2	2,7E-3
$k_{O_1C_1}$	s^{-1}	7,1E-1	6,2E-2
$k_{O_2C_2}$	s^{-1}	4,6E-3	1,6E-3
$k_{O_4C_4}=k_{O_3C_3}$	s^{-1}	>3E-1	
E_1	-	3,1E+0	5,6E-2
E_2	-	3,4E+0	5,0E-2

5.4.2 Ablauf der Assoziations- und Dissoziationsprozesse

Durch den Erhalt der Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten aus dem Markov-Modell kann man den Zeitverlauf in allen Offenzuständen ($P_{O,x}$; Abb. 30A) oder Geschlossenzuständen ($P_{C,x}$; Abb. 30B) einzeln erstellen ($x = 0$ bis 4).

Bei der sättigenden fcAMP-Konzentration (7,5 μ M; Abb. 30 rechts) kommt es zunächst zu einer schnellen Besetzung des vierfach ligandierten Zustandes O_4 . Der langsame Anstieg von P_0 ist durch die dann folgende langsame Besetzung von O_4 und die zeitgleiche langsame Leerung von C_2 zu erklären. Bei 0,75 μ M (Abb. 30, Mitte) ist direkt nach fcAMP-Zugabe ein schneller Anstieg des einfach ligandierten Zustandes O_1 zu beobachten, die langsame Aktivierung wird jedoch hauptsächlich durch den doppelt ligandierten Zustand O_2 getragen. Die Bindung an die geschlossenen Zustände wird ebenfalls nach einem schnellen Anstieg und folgendem Abfall von C_1 durch den doppelt ligandierten Zustand C_2 dominiert. Es ist bemerkenswert, dass bei der Bindung dieser mittleren fcAMP-Konzentration der vierfach ligandierter offene Zustand O_4 stärker als O_3 besetzt ist. Bei 0,075 μ M fcAMP (Abb. 30 links) bleiben die meisten Kanäle ohne Liganden. Die Ligandenbindung wird sowohl im offenen als auch im geschlossenen Kanal über die schnelle Einfachligandierung und die langsame Zweifachligandierung vermittelt.

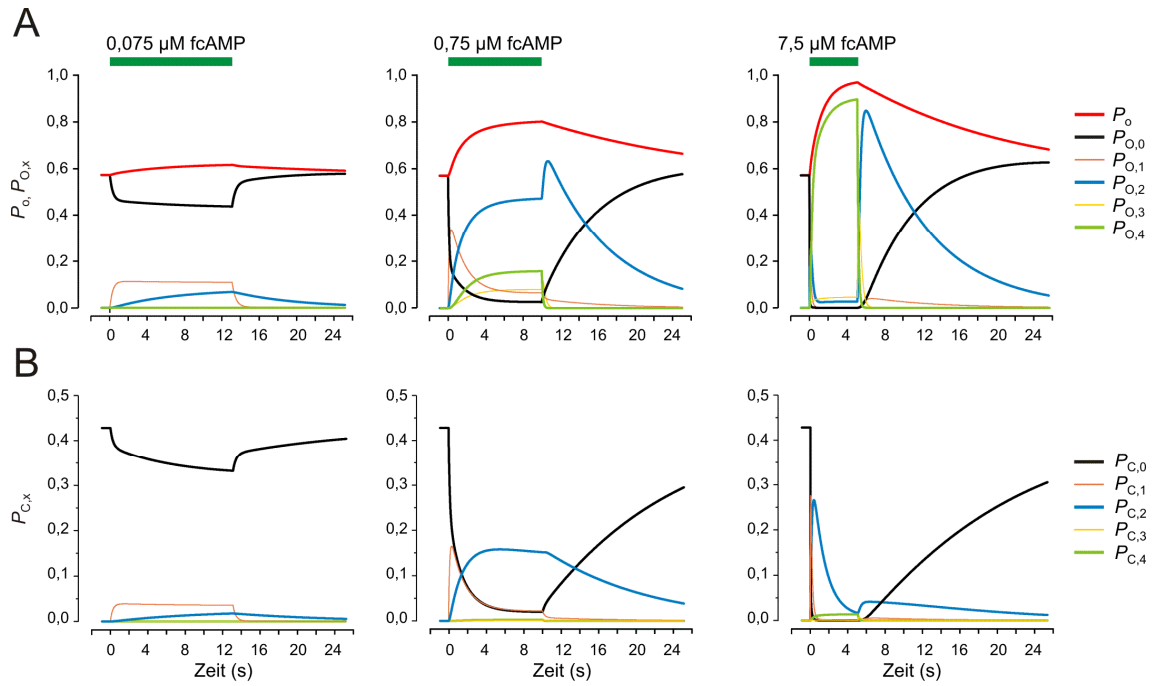


Abb. 30: Zeitverlauf der Besetzungszustände für das Modell in Abb. 28A bei drei fcAMP-Konzentrationen (verändert nach Kusch *et al.* 2011)

(A) Gesamte Offenwahrscheinlichkeit P_o (rote Kurve) und die Besetzung in jedem einzelnen Offenzustand x ($P_{o,x}$; $x= 0$ bis 4). Aufsummiert ergeben die einzelnen $P_{o,x}$ -Zustände P_o . (B) Geschlossenwahrscheinlichkeit in den Zuständen x , ($P_{c,x}$; $x= 0$ bis 4). Die Beträge von $P_{o,x}$ und $P_{c,x}$ summieren sich zu jedem Zeitpunkt zu eins.

Der Beitrag der einzelnen Ligandierungsstadien zur gesamten Bindung ist in Abb. 31 verdeutlicht.

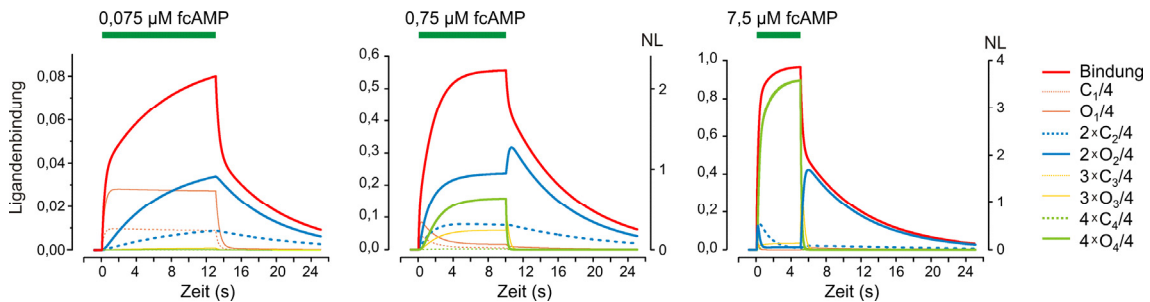


Abb. 31: Zeitverläufe der Ligandenbindung bei drei verschiedenen fcAMP-Konzentrationen (verändert nach Kusch *et al.* 2011)

Ligandenbindung an den gesamten Kanal (rote Kurve) und an die individuellen offenen (durchgezogene Linien) und geschlossenen (gestrichelte Linien) Zustände der Kanäle.

Betrachtet man die Dissoziation der Liganden, wird deutlich, dass die schnelle Phase direkt nach Ligandenentzug bei 7,5 und 0,75 μM fcAMP vorwiegend durch den Übergang des komplett ligandierten Zustand O_4 über O_3 in O_2 vermittelt wird. Bei 0,075 μM fcAMP wird die schnelle initiale Abspaltung hauptsächlich durch Leerung des einfach ligandierten Zustandes getragen (Abb. 31). Die langsame Dissoziation resultiert bei allen drei fcAMP-Konzentrationen aus dem langsamen Abfall des zweifach ligandierten Zustandes. Das ist bei Berücksichtigung der Tatsache, dass die Ligandenkonzentrationen einen weiten Bereich abdecken, bemerkenswert und legt eine ausgeprägte Kooperativität zwischen den Untereinheiten nahe.

5.4.3 Kooperativität der Bindungsschritte

Durch die Ergebnisse des Markov-Modells kann die Kooperativität von jedem Ligandierungsschritt errechnet werden. Diese wird anhand der Assoziationsgleichgewichtskonstanten betrachtet, die sich als Quadrat der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und der Rückreaktion der jeweiligen Bindungsschritte ergeben (z.B. $K_{AO0,1} = k_{O0O1}/k_{O1O0}$). Die Beziehung der Assoziationsgleichgewichtskonstanten $K_{AO0,1} < K_{AO1,2} > K_{AO2,3} < K_{AO3,4}$ und $K_{AC0,1} < K_{AC1,2} > > K_{AC2,3} < < K_{AC3,4}$ zeigt eine positiv-negativ-positive Kooperativität sowohl für offene als auch geschlossene Kanäle auf (Abb. 32). Die Kooperativität in Beziehung zur Affinität der Bindungsstellen ist also positiv für den zweiten und vierten Bindungsschritt und ausgeprägt negativ für den dritten Bindungsschritt. Die höchste Affinität zeigt die Bindung des zweiten Liganden ($K_{AO1,2}$ und $K_{AC1,2}$).

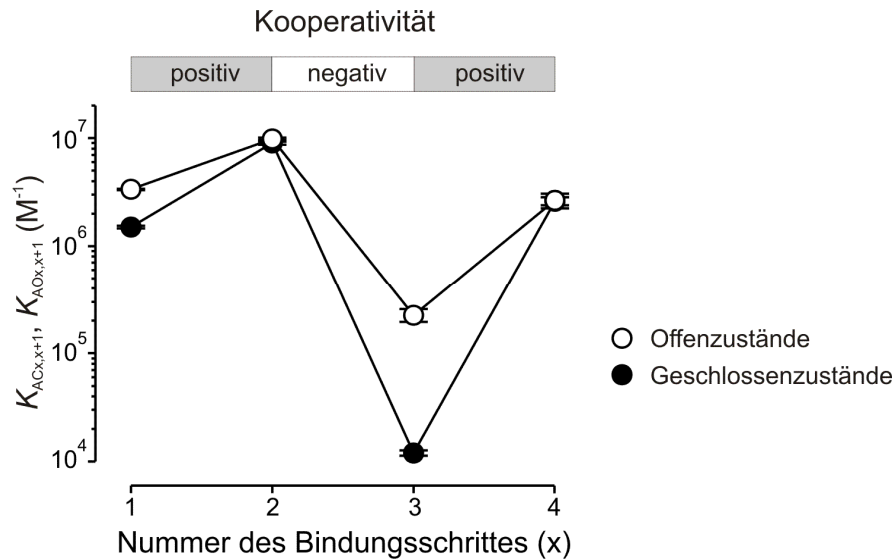


Abb. 32: Kooperativität der Ligandenbindungsschritte bezüglich der Assoziationsgleichgewichtskonstante (verändert nach Kusch *et al.* 2011)

Assoziationsgleichgewichtskonstanten $K_{ACx,x+1}$ und $K_{AOx,x+1}$ für die Ligandenbindung von Ligand Nr. x (x= 0 bis 3) in den geschlossenen und offenen Zuständen. $K_{ACx,x+1}$ berechnet sich aus $k_{Cx,Cx+1}/k_{Cx+1,Cx}$ (x=0 bis 3) und $K_{AOx,x+1}$ berechnet sich aus $k_{Ox,Ox+1}/k_{Ox+1,Ox}$ (x=0 bis 3).

Bei einem Vergleich der Abfolge der Offen-Geschlossen-Isomerisierungen (vgl. Abb. 28) geschieht die Aktivierung in einem zweistufigen Prozess (Abb. 33).

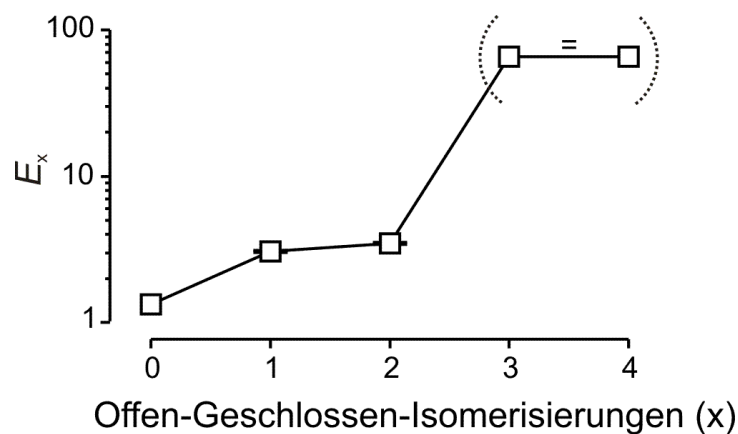


Abb. 33: Gleichgewichtskonstanten der Offen-Geschlossen-Isomerisierung E_x bei der Bindung von x Liganden (verändert nach Kusch *et al.* 2011)

E_x berechnet sich aus $k_{Ox,Cx}/k_{Cx,Ox}$ (x= 0 bis 4; vgl. Schema in Abb. 28).

Der erste Ligand trägt zu einem submaximalen Aktivierungsniveau bei, welches kaum noch durch die Bindung des zweiten Liganden erhöht wird. Die Bindung des dritten

Liganden bewirkt dann die maximale Öffnung. E_3 und E_4 wurden bei Erstellung des Modells gleich gesetzt.

Zuzüglich wurde die freie Enthalpie nach Gibbs (ΔG) für alle Offen- und Geschlossenzustände berechnet (Gleichung 6). In Abb. 34 sind die Energieprofile für die drei fcAMP-Konzentrationen dargestellt, wenn alle Energien auf die Energie von C_0 bezogen sind.

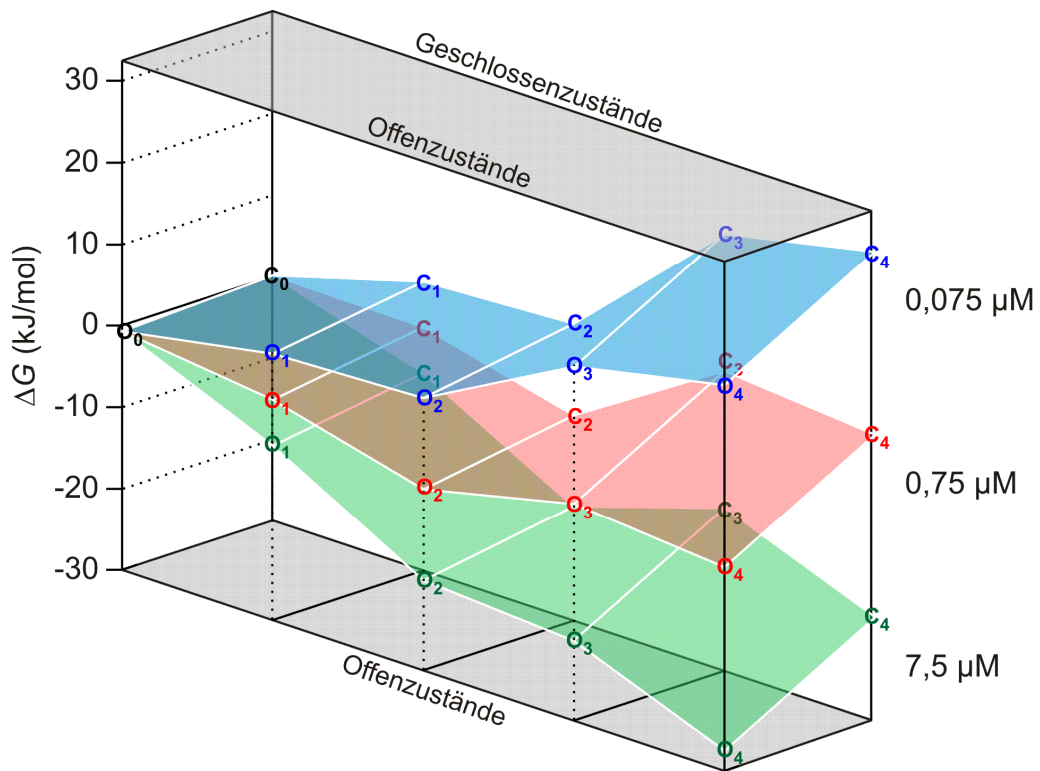


Abb. 34: freie Enthalpie nach Gibbs (ΔG) für das fcAMP-induzierte Schalten von HCN2-Kanälen (verändert nach Kusch *et al.* 2011)

Der unligandierte Geschlossenzustand C_0 wurde null gesetzt.

Bei steigender fcAMP-Konzentration, wird die Besetzung der mehrfach ligandierten Zustände wahrscheinlicher. Durch die Energieprofile wird nochmals hervorgehoben, dass die Zweifachligandierung sowohl im offenen als auch im geschlossenen Zustand begünstigt ist, da sich dort Energieminima befinden. Insgesamt werden die Zustände mit null, zwei und vier Liganden bevorzugt.

5.5 Austausch von cAMP gegen fcAMP an den Bindungsstellen

Um mehr über das Bindungsverhalten des physiologischen Liganden cAMP herauszufinden, wurde ein Austauschexperiment mit einer sättigenden cAMP und fcAMP-Konzentration (jeweils $7,5 \mu\text{M}$) durchgeführt. Dabei wurde nach einer Spannungsaktivierung (-130 mV) cAMP durch fcAMP ersetzt (Abb. 35). Nach einer folgenden Deaktivierung der Kanäle durch einen Spannungssprung auf -30 mV wurde erneut spannungsaktiviert (-130 mV), um die Maximalfluoreszenz zu erhalten.

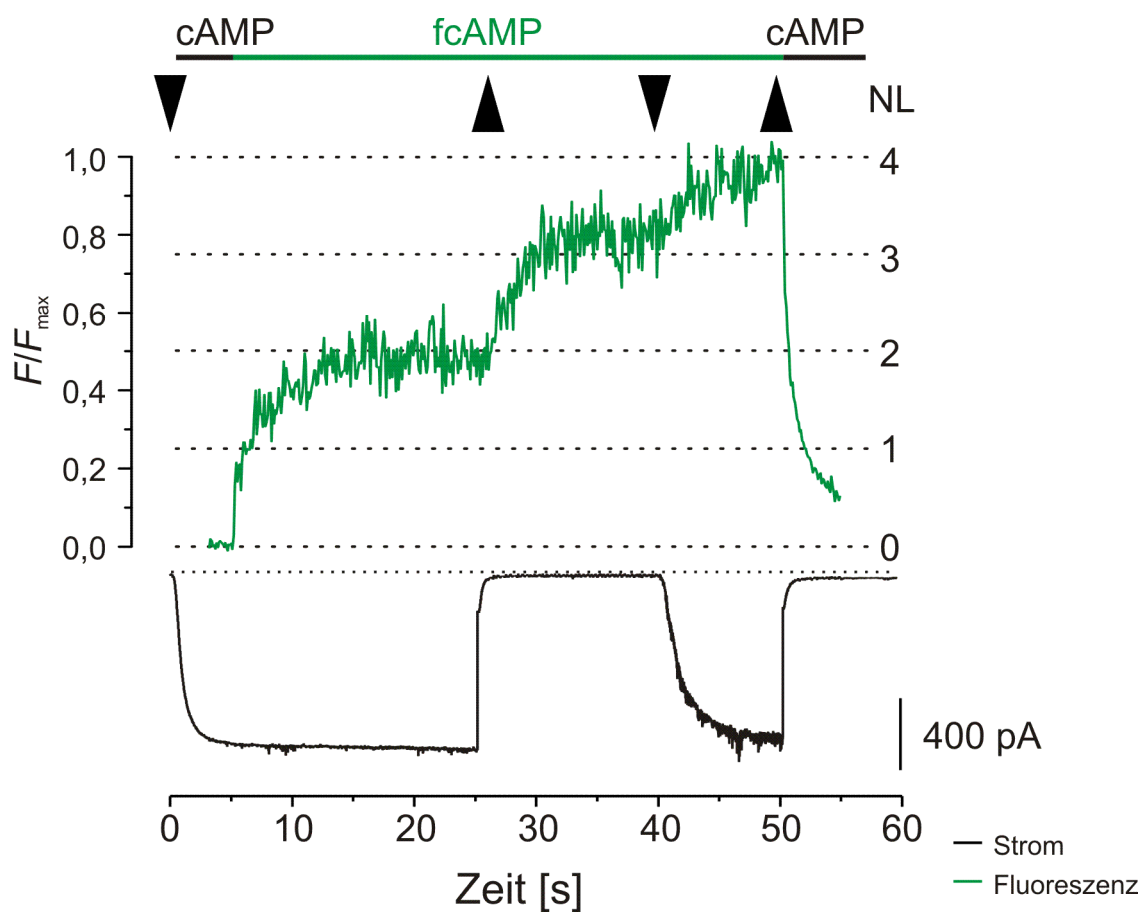


Abb. 35: Beispielmessung für den Austausch von sättigendem cAMP gegen fcAMP (verändert nach Kusch *et al.* 2011)

Abwärtsgerichtete Dreiecke zeigen die Spannungssprünge von -30 mV auf -130 mV und aufwärtsgerichtete Dreiecke den Sprung von -130 mV auf -30 mV an.

Durch das Anlegen der Spannung von -130 mV und durch das Anspülen einer sättigenden cAMP-Konzentration wurden in der ersten Phase des Experimentes alle

verfügbaren Bindungsstellen der Kanäle besetzt. Mittels Zugabe einer sättigenden fcAMP-Konzentration sollten anschließend alle frei werdenden Bindungsstellen mit fcAMP besetzt werden. Nach einem relativ schnellen Abfall von 25% der Maximalfluoreszenz fielen weitere 25% nur langsam. 20 Sekunden nach Zugabe von fcAMP betrug die mittlere Fluoreszenz jedoch nur $53,8 \pm 4,5\%$ der Maximalfluoreszenz (Abb. 36).

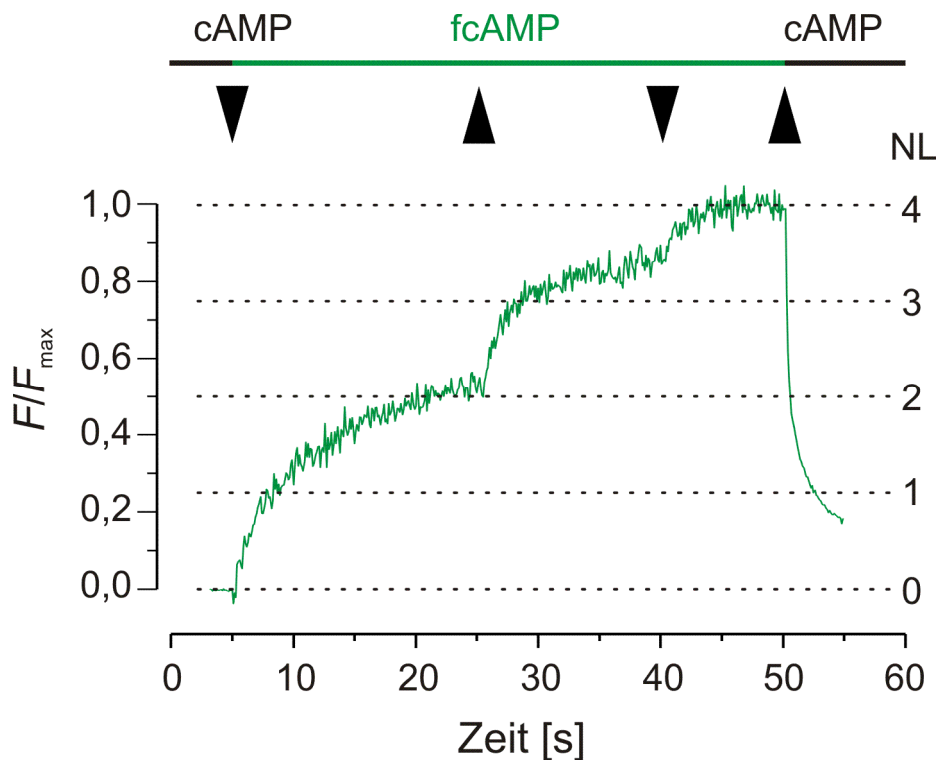


Abb. 36: Mittlere Fluoreszenz der Austauschexperimente von cAMP gegen fcAMP

Abwärtsgerichtete Dreiecke zeigen die Spannungssprünge von -30 mV auf -130 mV und aufwärtsgerichtete Dreiecke den Sprung von -130 mV auf -30 mV an (n = 9).

Nach Deaktivierung durch einen depolarisierenden Spannungssprung auf -30 mV erhöhte sich die Fluoreszenz weiter auf $84,5 \pm 2,3\%$. Erst eine erneute Aktivierung der Kanäle durch den hyperpolarisierenden Spannungssprung auf -130 mV konnte die maximale Fluoreszenz hervorrufen.

Dieses Experiment zeigt, dass durch das Angebot des fluoreszierenden Farbstoffs nur die Hälfte der Bindungsstellen, also vermutlich zwei Bindungsstellen pro Kanal, durch fcAMP während der Spannungsaktivierung bei -130 mV besetzt werden konnten. An den anderen beiden Bindungsstellen fand offensichtlich nur eine extrem langsame Dissoziation von cAMP statt, welche nicht experimentell ermittelt werden konnte. Erst

die spannungsinduzierte Deaktivierung führte zu einer Dissoziation der „gefangenen“ cAMP-Moleküle und erlaubte einen Austausch durch fcAMP. Da nicht-aktivierte Kanäle bei 7,5 μM fcAMP eine geringere Ligandenbindung zeigen als aktivierte Kanäle (Kusch *et al.* 2010), konnte die maximale fcAMP-Bindung erst nach erneuter Aktivierung hervorgerufen werden.

6 Diskussion

HCN-Kanäle sind durch die Erzeugung eines depolarisierenden, kationischen Stromes an vielen wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt. Sie erzeugen nicht nur eine Schrittmacherfunktion in Herz- und Nervenzellen, sondern sind beispielsweise auch an der Kontrolle des Ruhemembranpotentials in vielen Neuronen beteiligt (Pape 1996, Robinson 2003). Bei der Regulation dieser Prozesse spielt der physiologische Ligand cAMP eine wichtige Rolle (Biel *et al.* 2009). Über die genauen Mechanismen der Kanalregulation durch zyklische Nukleotide ist bisher nicht viel bekannt. Durch die vorliegende Arbeit werden elementare Erkenntnisse über das Assoziations- und Dissoziationsverhalten von zyklischen Nukleotiden in Abhängigkeit von Konzentration und Aktivierungszustand gewonnen und neue Einblicke in die Kooperation der Untereinheiten in HCN2-Kanälen gewährt. Große Teile der Diskussion werden in Kusch *et al.* 2011 veröffentlicht.

6.1 Der Effekt des Liganden auf die *Steady-state*-Aktivierungskurve

HCN-Kanäle werden zwar durch hyperpolarisierende Membranspannungen geöffnet, zusätzlich wird die Aktivierung jedoch durch die Bindung zyklischer Nukleotide gesteigert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Verschiebung der *Steady-state*-Aktivierungskurve, die Beschleunigung der Aktivierungskinetik und die Erhöhung des Maximalstroms durch cAMP, wie schon in der Literatur beschrieben (Craven und Zagotta 2006, DiFrancesco und Tortora 1991, Wainger *et al.* 2001), beobachtet und quantifiziert. Diese Modulationen werden nicht mit einer größeren Einzelkanalleitfähigkeit, sondern durch die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit durch die Bindung von cAMP erreicht (DiFrancesco 1986, DiFrancesco und Mangoni 1994).

Die Kanalaktivierung in Gegenwart von cAMP wurde bei verschiedenen Membranspannungen semilogarithmisch aufgetragen. Mit einer modifizierten Hill-Funktion (Gleichung 2) konnte die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) und der Hill-Koeffizient (H) ermittelt werden. Eine stärkere Hyperpolarisation verschiebt den EC_{50} -Wert zu geringeren cAMP-Konzentrationen. Der Kanal wird also mit steigendem Grad

der spannungsabhängigen Aktivierung sensitiver für den Liganden cAMP. In der Literatur ist es üblich, den EC_{50} -Wert von HCN-Kanälen als Ligandenkonzentration, welche die mittlere Verschiebung der *Steady-state*-Aktivierungskurve ($V_{1/2}$) bewirkt, zu ermitteln (DiFrancesco und Tortora 1991, Ulens und Siegelbaum 2003). Da die Ligandenabhängigkeit von HCN-Kanälen bei verschiedenen Membranspannungen variiert, ist diese Methode allerdings kritisch zu betrachten.

Weiterhin steigt der Hill-Koeffizient mit zunehmender Hyperpolarisation von 0,71 auf 1,45. Der Hill-Koeffizient ist ein grobes Maß für die Kooperativität der Untereinheiten. Hill-Koeffizienten über 1, wie bei HCN2-Kanälen bei stärker hyperpolarisierenden Spannungen für cAMP ermittelt, weisen darauf hin, dass mehrere Kanaluntereinheiten miteinander interagieren. Der Hill-Koeffizient erlaubt allerdings keine Aussage zu konkreten molekularen Mechanismen der ligandeninduzierten Aktivierung.

Obwohl die Hill-Funktion und die daraus abgeleiteten Parameter für eine biophysikalische Interpretation kritisch zu betrachten sind, deutet die Spannungsabhängigkeit von EC_{50} und H an, dass spannungs- und ligandenabhängige Aktivierung gekoppelt sind.

6.2 Kanalverhalten bei [cAMP]-Sprüngen

Der ligandeninduzierte Effekt wurde getrennt vom Effekt der Membranspannung untersucht. Dabei wurden HCN2-Kanäle zuerst spannungsaktiviert und anschließend zusätzlich durch cAMP aktiviert. Dies erfolgte durch einen schnellen cAMP-Sprung von null auf eine von drei definierten cAMP-Konzentrationen. Die ermittelte Aktivierungskinetik der zusätzlichen Aktivierung durch cAMP zeigte keine Sigmoidität. Dieses Verhalten ist ähnlich dem der verwandten CNGA2-Kanälen, wenn sie durch cGMP-Sprünge aktiviert wurden (Nache *et al.* 2005).

Die Aktivierungskinetik war sowohl bei größeren cAMP-Konzentrationen als auch bei stärker hyperpolarisierenden Spannungen beschleunigt. Diese Ergebnisse bekräftigen eine enge Verbindung zwischen spannungs- und ligandenbedingter Aktivierung, da ohne eine Wechselwirkung der beiden Mechanismen die cAMP-induzierte Aktivierung bei allen Membranspannungen, die zur Kanalöffnung führen, das gleiche Verhalten zeigen müsste.

Zwar kann bei der Deaktivierung des cAMP-abhängigen Stromes nach Ligandenentzug kein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen cAMP-Konzentrationen festgestellt werden, die Abhängigkeit von der Membranspannung ist hingegen sehr deutlich. Bei -90 mV fällt die Stromamplitude des cAMP-abhängigen Stromes im Mittel nach 40 Sekunden um 50 bis 68%, während bei stärker hyperpolarisierenden Membranspannungen die Deaktivierung nach 40 Sekunden nur 2 bis 22% beträgt. Also nur bei einer Spannung, bei welcher sich die Kanäle im *inside-out*-Patch ohne cAMP nicht öffnen würden, ist eine erheblicher Rückgang der Aktivierung zu beobachten. Es sollte also entweder einen Mechanismus im Kanalprotein geben, der die Konformationsänderung welche durch cAMP-Bindung verursacht wird, auch ohne Ligandenbindung, gewissermaßen „einfriert“, oder der Ligand wird im aktivierten Zustand extrem langsam in die Lösung abgegeben und bleibt auch bei einem Wechsel auf cAMP-freie Lösung weiterhin lange an der CNBD gebunden. Auf jeden Fall muss es sich um einen spannungsabhängigen Mechanismus handeln.

Um die Vorgänge an der Bindungsstelle direkter untersuchen zu können, wurden die elektrophysiologischen Untersuchungen mit Fluoreszenzmikroskopie-Techniken kombiniert.

6.3 Aktivierungsbedingte Ligandenbindung

Mittels konfokaler Patch-Clamp-Fluorometrie (Biskup *et al.* 2007) wurde mit Hilfe des fluoreszierenden Liganden fcAMP (DY-547-AET-cAMP) (Kusch *et al.* 2010) das Bindungsverhalten an HCN2-Kanälen beobachtet. Zunächst soll betrachtet werden, ob und wenn ja in welcher Art und Weise die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals bei kontinuierlicher Anwesenheit von cAMP die Ligandenbindung beeinflusst.

Das fluoreszierende cAMP-Derivat fcAMP verschiebt wie cAMP die *Steady-state*-Aktivierungskurve zu positiveren Spannungen, jedoch mit dem Unterschied, dass die halbmaximale Spannung in Sättigung um ca. 6,6 mV negativer ist als mit sättigenden cAMP-Konzentrationen. Außerdem wird der gleiche Maximalstrom wie mit cAMP-Sättigung erreicht. Auch wenn man über Aktivierungsdaten kaum auf die Bindung rückschließen kann, lassen diese Ergebnisse eher vermuten, dass fcAMP insgesamt mit etwas geringerer Affinität als der physiologische Ligand cAMP an HCN2-Kanäle bindet. Denn dazu passt auch die langsamere Aktivierungskinetik und eine schnellere

Deaktivierungskinetik bei der Aktivierung durch schnelle fcAMP-Sprünge im Vergleich zu cAMP. Aufgrund ähnlicher Struktur und Wirkung der beiden zyklischen Nukleotide wurde fcAMP in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem für die cAMP-Bindung verwendet.

Ein grundlegendes Prinzip für physikochemische Prozesse ist das Prinzip der Reziprozität: Wenn eine Größe A eine andere Größe B beeinflusst, dann muss B auch A beeinflussen; oder auf Rezeptor und Liganden bezogen: Wenn die Ligandenbindung die Aktivierung beeinflusst, dann muss die Aktivierung auch die Ligandenbindung beeinflussen (Colquhoun 1998, Edsall und Wyman 1958). Die Bindung von zyklischen Nukleotiden beeinflusst die Aktivierung von HCN2-Kanälen positiv. Über elektrophysiologische Messungen wurde schon früher indirekt gezeigt, dass sich die cAMP-Affinität der Bindungsdomäne aktivierungsabhängig ändert (Wang *et al.* 2002). Nun wurde mittels konfokaler Patch-Clamp-Fluorometrie eine Steigerung der fcAMP-Bindung bei Spannungsaktivierung der HCN2-Kanäle beobachtet, die das Prinzip der Reziprozität für die Ligandenbindung an den Kanälen direkt beweisen konnte (Kusch *et al.* 2010). Dieser Sachverhalt bestätigte sich auch in einer Studie mit 8-NBD-cAMP (Wu *et al.* 2011).

Außerdem wurde durch die quantitative Auswertung der Fluoreszenz bei verschiedenen Spannungen und fcAMP-Konzentrationen herausgefunden, dass nur zwei von vier möglichen Liganden für die komplette ligandenbedingte Aktivierung ausreichen (Kusch *et al.* 2010). Es ist jedoch zu beachten, dass der hierbei angewendeten quantitativen Bestimmung der im Mittel gebundenen Liganden pro Kanal, eine Annahme zu Grunde liegt. Denn es ist zwar naheliegend, aber bisher nicht erwiesen, dass jedes fcAMP-Molekül am Kanal genau ein Viertel der maximalen Fluoreszenz emittiert. Diese Annahme könnte man aber eventuell über das schrittweise Bleichen von fluoreszierenden Liganden an Einzelkanälen belegen (Schmidt *et al.* 1996, Ulbrich und Isacoff 2007).

6.4 Bindung und Dissoziation bei schnellen Ligandensprüngen

Im Folgenden soll diskutiert werden, wie die Experimente bei Aktivierung und Bindung unter Nichtgleichgewichtsbedingungen einzuordnen sind. Bindung und Dissoziation von fcAMP wurde bei verschiedenen Konzentrationen nach Spannungsaktivierung auf

-130 mV, einer nahezu sättigenden Spannung, gemessen. Vergleichsmessungen wurden ohne Spannungsaktivierung bei -30 mV durchgeführt.

Die Bindung des fluoreszierenden Liganden auf den jeweiligen Maximalwert läuft ohne Kanalaktivierung bei -30 mV schneller ab als mit Kanalaktivierung bei -130 mV. Man muss dabei aber beachten, dass die Fluoreszenz bei -30 mV auf einem wesentlich geringeren Maximalniveau (F/F_{\max}) den Gleichgewichtszustand erreicht. Bei 7,5 μM fcAMP, einer fcAMP-Konzentration, bei der das jeweilige Fluoreszenzmaximum im nichtaktivierten Zustand nur geringfügig kleiner ist als im aktivierten Zustand, ist die Bindungsgeschwindigkeit nur unwesentlich schneller bei -30 mV im Vergleich zu -130 mV. Dies zeigt, dass die rasche Bindung bei beiden Spannungen ähnlich ist.

Eine skalierte Überlagerung der gemittelten Stromspuren mit den gemittelten Fluoreszenzen (Abb. 26) zeigt einen nahezu identischen Verlauf der langsamen Bindung und der Kanalaktivierung. Die Bindung der Liganden bei Kanalaktivierung steht demnach in einem engen Zusammenhang mit der darauf folgenden Stromantwort.

Vergleicht man die Verläufe der Dissoziation des Liganden im nicht aktivierten Zustand mit denen im aktivierten Zustand, ist die Kinetik im aktivierten Zustand langsamer. Die Bindungsstelle zeigt also bei Spannungsaktivierung nicht nur ein verändertes Bindungs- sondern auch ein verändertes Dissoziationsverhalten im Vergleich zum nicht aktivierten Zustand. Wie bedeutend die Spannungsaktivierung bei der Dissoziation des Liganden ist, wird außerdem durch die Wegnahme der Spannungsaktivierung neun Sekunden nach Ligandenentzug demonstriert. Denn durch die Deaktivierung der Kanäle wird sofort eine extreme Beschleunigung der fcAMP-Abspaltung beobachtet.

Der schnelle Fluoreszenzabfall um die Hälfte der Maximalfluoreszenz bei Entfernung der sättigenden fcAMP Konzentrationen legt direkt die schnelle Dissoziation von zwei der vier möglichen gebundenen Liganden nahe, während die verbleibenden zwei Liganden nur langsam dissoziieren.

Bei 0,75 μM fcAMP fehlt die schnelle initiale Abspaltung, da im Mittel nur 2,2 Liganden pro Kanal gebunden haben. Also auch bei einer mittleren Ligandenkonzentration werden die Hälfte der maximal möglichen Liganden scheinbar „festgehalten“. Ein deutliches Anzeichen dafür, dass bei der Dissoziation bei 7,5 und 0,75 μM fcAMP derselbe Prozess zugrunde liegt, ist das exakte Übereinstimmen der Zeitverläufe der Abspaltung nach einer zeitlichen Verschiebung des 0,75 μM -Fluoreszenzsignals um 840 ms (Abb. 27). Die ersten beiden schnell dissoziierenden Liganden benötigen somit im Mittel 840 ms zur Dissoziation.

Die Dissoziation bei 0,075 μM fcAMP zeigt auch einen schnellen Fluoreszenzabfall der von einem langsamen Abfall der Fluoreszenz gefolgt wird. Da bei dieser geringen Konzentration im Mittel nur 0,3 Liganden pro Kanal gebunden sind, ist eine Interpretation ohne Modell nur schwer möglich.

Bei der Überlagerung der langsamen Phase der Dissoziation mit der skalierten Deaktivierung (Abb. 26) wird die enge Koppelung der ablaufenden Prozesse offensichtlich. Der Zeitverlauf ist aber erst etwa vier Sekunden nach der Wegnahme von 7,5 und 0,75 μM fcAMP nahezu gleich, was nahe legt, dass das ligandenbedingte Schließen der Kanäle über einige Sekunden langsamer ist als die Dissoziation des Liganden. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass auch beim spannungsabhängigen Schließen der Kanäle die Dissoziation eines anderen cAMP-Derivats (8-NBD-cAMP) langsamer als das Schließen der Kanäle ist (Wu *et al.* 2011), was mit fcAMP aber nicht beobachtet wurde (Kusch *et al.* 2010).

6.5 Approximation von Bindung und Aktivierung mit einem Markov-Modell

Durch eine globale Approximation der Bindungs- und Aktivierungsdaten bei Sprüngen von drei fcAMP-Konzentrationen konnte ein geeignetes Markov-Modell mit allen Geschwindigkeitskonstanten ermittelt werden und daraus resultierend die zeitabhängige Besetzung aller individuellen Offenzustände ($P_{O,x}$) und Geschlossenzustände ($P_{C,x}$), (Abb. 30).

Die errechneten Zeitverläufe der einzelnen Ligandierungsstadien decken die Komplexität der Interaktion der Untereinheiten bei verschiedenen fcAMP-Konzentrationen auf. So wird deutlich, dass die schnelle Dissoziation bei Sättigung durch die schnelle Dissoziation des vierten und dritten Liganden im offenen Zustand hervorgerufen wird. Bei 0,075 μM fcAMP wird der schnelle initiale Fluoreszenzabfall durch die schnelle Dissoziation der Kanäle, die im einfach ligandierten Zustand sind, hervorgerufen. Der langsame Fluoreszenzabfall entsteht bei allen drei fcAMP-Konzentrationen durch die langsame Dissoziation des zweiten Liganden. Hat dieser die Bindungsdomäne verlassen, folgt der erste Ligand schnell. Bemerkenswert ist, dass der doppelt ligandierte Zustand extrem bevorzugt wird, dass nach 13 Sekunden bei 0,075 μM fcAMP, also bei 8% der Bindung, über die Hälfte der Fluoreszenz von diesem

Zustand beigetragen wird, obwohl man statistisch erwarten sollte, dass maximal ein oder eben kein Ligand am Kanal gebunden hat. Anhand der Geschwindigkeitskonstanten wird offensichtlich, dass abhängig von der Ligandenkonzentration bestimmte Zustände sowohl im offenen als auch im geschlossenen Zustand bei HCN2-Kanälen bevorzugt werden. So sind die Konfigurationen mit null, zwei oder vier Liganden stabiler als die mit einem oder drei Liganden.

Bei Betrachtung der Assoziationsgleichgewichtskonstanten zeigt sich die höchste Affinität für den zweiten Liganden. Aber auch die Affinität für den vierten Liganden ist höher als für den Dritten. Es gibt also einen positiv kooperativen Effekt der Bindung von Ligand Nummer 2 bzw. Nummer 4. Im Gegensatz dazu ist die Affinität des dritten Liganden viel geringer als die des zweiten Liganden, was einen ausgeprägt negativen kooperativen Effekt der Bindung des dritten Liganden aufzeigt. Bei einem Vergleich der Affinitäten von offenen mit geschlossenen Kanälen gibt es mit Ausnahme der Affinität des dritten Liganden nur geringe Unterschiede. Offensichtlich ist die starke Änderung der Offen-Geschlossen-Isomerisierung hin zum Offenzustand der Grund für die 20fach höhere Affinität des dritten Liganden im Offenzustand (Abb. 33).

Die Änderung der Assoziationsgleichgewichtskonstanten mit zunehmender Bindung und die abgeleiteten Energieprofile (Abb. 34) legen den Gedanken nahe, dass die tetramere Bindungsstelle als doppeltes Dimer fungiert. Dabei fördert die Bindung des ersten Liganden die Bindung des zweiten Liganden im ersten Dimer. Dann wird die Bindung des dritten Liganden durch das erste Dimer erschwert. Wenn dieser jedoch bindet, befördert der dritte Ligand die Bindung des vierten Liganden im selben Dimer. Also würde eine Bindung innerhalb eines Dimers eine positive Kooperativität herbeiführen, während die Interaktion der beiden Dimere eine negative Kooperativität verursachen würde. Trotz der strukturell vierfachen Symmetrie der Bindungsstelle (Zagotta *et al.* 2003) ist die Bindung also funktionell ein Mechanismus mit zwei Schritten.

Die vorliegenden Ergebnisse über die ligandenabhängige Aktivierung der vier HCN2-Untereinheiten weichen dementsprechend von grundlegenden Annahmen des Monod-Wyman-Changeux-Modells (MWC-Modell) für allosterische Proteine (Monod *et al.* 1965) ab. So wird vorausgesetzt, dass ein konstanter Faktor für jeden Bindungsschritt spezifiziert, wie stark das Offen-Geschlossen-Gleichgewicht zum Offenzustand verschoben wird und wie stark die Bindungsaffinität im offenen Kanal die des

geschlossenen übertrifft. Schon früher wurden über Widersprüche bezüglich des Verhaltens von allosterischen Proteinen zum dem MWC-Modell bei homologen CNGA2- und spHCN-Kanälen berichtet (Biskup *et al.* 2007, Bruening-Wright *et al.* 2007).

Da die einzelnen Untereinheiten miteinander in Kontakt treten, um einen Ionenkanal zu bilden, ist eine Interaktion der Untereinheiten natürlich zwingend notwendig. Die Bindung des ersten Liganden zerstört automatisch die wahrscheinliche Vierfachsymmetrie des ligandenfreien Kanals und ändert vermutlich auch die Konformation der benachbarten bzw. der gegenüberliegenden Untereinheit in unterschiedliche Weise. So ist es eigentlich kaum überraschend, dass die Affinität der einzelnen Liganden im HCN2-Homotetramer so unterschiedlich ist.

Bisher wurde lediglich die spannungsabhängige Aktivierung von HCN-Kanälen anhand von Modellen erklärt (Altomare *et al.* 2001, Bruening-Wright *et al.* 2007). Das in dieser Arbeit vorgestellte Markov-Modell mit sämtlichen Geschwindigkeitskonstanten trägt zum weiteren Verständnis bei, indem ligandenabhängige Vorgänge betrachtet wurden. Jedoch gilt es nur für das Bindungsverhalten von fcAMP bei -130 mV, also bei einer nahezu maximal aktivierenden Membranspannung. Es deckt somit ebenso lediglich einen Teil des Aktivierungsvorgangs ab. Ein Modell, welches sowohl die spannungs- als auch ligandenabhängige Aktivierung von HCN-Kanälen beschreiben könnte, wäre dreidimensional und würde bei vier Untereinheiten 50 Zustände aufweisen. Das Anpassen eines solchen Modells ist momentan kaum denkbar.

Letztlich ist zu beachten, dass die Festsetzung der Offenwahrscheinlichkeit von 98,5% bei -130 mV Membranspannung und cAMP-Sättigung für das quantifizierte Markov-Modell eine mögliche Fehlerquelle ist. Diese Annahme wurde getätigt, weil eine nahezu maximale Offenwahrscheinlichkeit bei dieser Spannung und cAMP-Sättigung für HCN2-Kanäle vermutet wurde (Dekker und Yellen 2006). Man sollte aber berücksichtigen, dass nach dem Exzidieren des zu vermessenden Patches das sogenannte „run-down“-Phänomen auftritt, welches eventuell durch den Verlust von intrazellulären Phospholipiden erklärt werden kann (Pian *et al.* 2006, Pian *et al.* 2007, Zolles *et al.* 2006). Die Vermutung liegt nahe, dass die Offenwahrscheinlichkeit nach Ablauf des „run-down“ nicht mehr maximal ist, da durch dieses Phänomen der Maximalstrom verringert wird und die Strom-Spannungs-Kurve zu negativeren Spannungen verschoben wird (DiFrancesco *et al.* 1986). Würden durch den „run-down“

lediglich einzelne Kanäle nicht mehr aktivierbar sein, sollte man annehmen, dass dieses Phänomen ausschließlich den Maximalstrom verringert.

6.6 Dissoziation des physiologischen Liganden cAMP

Über den durchgeführten Austausch von cAMP-Molekülen mit fcAMP-Molekülen war es möglich, Informationen über das Dissoziationsverhalten des physiologischen Liganden cAMP während der Kanalaktivierung zu erhalten. Dieser Austausch wurde mit sättigenden Konzentrationen beider Liganden durchgeführt, da so mit hoher Wahrscheinlichkeit alle Bindungsstellen mit Liganden besetzt waren.

HCN2-Kanäle weisen 40 Sekunden nach cAMP-Entzug einen sehr geringen Abfall der cAMP-abhängigen Stromkomponente auf, während die Deaktivierung nach fcAMP-Entzug schon nach 9 Sekunden fast die Hälfte des ligandenabhängigen Stromes beträgt. Durch das Austauschexperiment wird festgestellt, dass bei einer Kanalaktivierung (-130 mV) 20 Sekunden nach cAMP-Entzug ein annähernder Gleichgewichtszustand des Fluoreszenzsignals erreicht wird und offensichtlich noch etwa die Hälfte der Bindungsstellen mit cAMP besetzt sind. Diese cAMP-Moleküle wurden erst nach Kanaldeaktivierung (Spannungssprung auf -30 mV) wieder freigegeben, so dass die Bindungsstellen durch fcAMP besetzt werden konnten. Während der Kanalaktivierung bleiben also zwei der vier möglichen cAMP-Moleküle pro Kanal gebunden und werden kaum noch in die Lösung gegeben. Der physiologische Ligand cAMP wird demnach stärker „gefangen“ als fcAMP, was mit der schon vermuteten höheren Affinität des natürlichen Liganden zur Zyklonukleotidbindungsdomäne zu erklären ist.

Dadurch wird gezeigt, warum sich der cAMP-abhängige Strom nach cAMP-Entzug kaum verringert: Während der Spannungsaktivierung werden zwei cAMP-Moleküle pro HCN2-Kanal festgehalten, und nur zwei Moleküle pro Kanal reichen für eine maximale Öffnung aus.

Die durchgeführten Experimente geben leider keine Auskunft darüber, in welcher relativen Position die zwei Liganden im tetrameren Kanal binden. Es wäre denkbar, dass der zweite Ligand an eine der beiden Nachbaruntereinheiten des ersten Liganden bindet, da eine Interaktion zwischen benachbarten Untereinheiten direkter erfolgen kann als eine Interaktion mit der gegenüberliegenden Bindungsstelle. Bindet der zweite Ligand dagegen an die Untereinheit gegenüber dem ersten Liganden, könnte sich eine

bessere Symmetrie der vermutlich dimeren Konfiguration ausbilden. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass beide Kombinationen vorkommen. Diese offene Frage könnte man eventuell mit Messungen an Konkaternen beantworten, in denen in kontrollierter Weise cAMP-bindende und mutierte, nicht-bindende Untereinheiten kombiniert werden (Ulens und Siegelbaum 2003).

7 Schlussfolgerungen

1. Die spannungsabhängige Aktivierung von HCN2-Kanälen beeinflusst sowohl den EC_{50} -Wert als auch den Hill-Koeffizienten für die cAMP-Bindung.
2. Die cAMP-induzierte Aktivierung wird durch stärkere Hyperpolarisation beschleunigt, die Deaktivierung nach cAMP-Entzug dagegen verlangsamt.
3. Für Ligandenbindung und Kanalaktivierung konnte das Prinzip der Reziprozität nachgewiesen werden. Ligandenbindung aktiviert den Kanal und Aktivierung des Kanals erhöht die Affinität für den Liganden.
4. Die vollständige Ligandendissoziation nach cAMP-Entzug erfolgt in nicht-aktivierten Kanälen wesentlich schneller als in aktivierten Kanälen.
5. Zustände in denen null, zwei oder vier Liganden pro Kanal gebunden sind, werden gegenüber einfach- oder dreifachligandierten Zuständen bei einer Spannungsaktivierung von -130 mV bevorzugt. Das legt eine Organisation der Untereinheiten als zwei funktionelle Dimere nahe.
6. Die Bindung des zweiten, dritten und vierten Liganden zeigt eine Kooperativität in der Sequenz positiv-negativ-positiv in aktivierten Kanälen.
7. Nach Entzug des physiologischen Liganden cAMP dissoziiert der zweite Ligand extrem langsam bei einer Spannungsaktivierung von -130 mV.
8. Die ligandenbedingte Aktivierung in HCN2-Kanälen ist ein sehr komplexer kooperativer Prozess. Zyklonukleotidbindungsdomänen agieren auf unterschiedliche Weise, obwohl sie isoliert vom transmembranären Anteil des Kanals eine vierfach symmetrische Struktur haben.

8 Literaturverzeichnis

Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A, DiFrancesco D. 2001. Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *Journal of General Physiology*, 117 (6): 519-32.

Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M, DiFrancesco D. 2003. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *Journal of Physiology*, 549 (Pt 2): 347-359.

Bader CR, Macleish PR, Schwartz EA. 1979. A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *Journal of Physiology*, 296: 1-26.

Berman HM, Ten Eyck LF, Goodsell DS, Haste NM, Kornev A, Taylor SS. 2005. The cAMP binding domain: an ancient signaling module. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (1): 45-50.

Bezannilla F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews*, 80 (2): 555-592.

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X. 2009. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiological Reviews*, 89 (3): 847-885.

Biskup C, Kusch J, Schulz E, Nache V, Schwede F, Lehmann F, Hagen V, Benndorf K. 2007. Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels. *Nature*, 446 (7134): 440-443.

Brown HF, Giles W, Noble SJ. 1977. Membrane currents underlying activity in frog sinus venosus. *Journal of Physiology*, 271 (3): 783-816.

Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. 1979. How does adrenaline accelerate the heart. *Nature*, 280 (5719): 235-236.

Bruening-Wright A, Elinder F, Larsson HP. 2007. Kinetic relationship between the voltage sensor and the activation gate in spHCN channels. *Journal of General Physiology*, 130 (1): 71-81.

Chaplan SR, Guo HQ, Lee DH, Luo L, Liu CL, Kuei C, Velumian AA, Butler MP, Brown SM, Dubin AE. 2003. Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*, 23 (4): 1169-1178.

Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. 2001. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *Journal of General Physiology*, 117 (5): 491-504.

Colquhoun D. 1998. Binding, gating, affinity and efficacy: The interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *British Journal of Pharmacology*, 125 (5): 924-947.

Craven KB, Zagotta WN. 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annual Review of Physiology*, 68: 375-401.

Dekker JP, Yellen G. 2006. Cooperative gating between single HCN pacemaker channels. *Journal of General Physiology*, 128 (5): 561-567.

DiFrancesco D. 1986. Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature*, 324 (6096): 470-473.

DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. 1986. Properties of the hyperpolarizing-activated current (i_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *Journal of Physiology*, 377: 61-88.

DiFrancesco D, Tromba C. 1988. Inhibition of the hyperpolarization-activated current (i_f) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes. *Journal of Physiology-London*, 405: 477-491.

DiFrancesco D, Tromba C. 1988. Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (i_f) in rabbit sino-atrial node myocytes. *Journal of Physiology-London*, 405: 493-510.

DiFrancesco D. 1991. Generation and control of cardiac pacing - the pacemaker current. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 1 (6): 250-255.

DiFrancesco D, Tortora P. 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, 351 (6322): 145-147.

- DiFrancesco D, Mangoni M. 1994. Modulation of single hyperpolarization-activated channels (I_f) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *Journal of Physiology*, 474 (3): 473-482.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science*, 280 (5360): 69-77.
- Dumont JN. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). 1. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, 136 (2): 153-179.
- Edsall JT, Wyman J. 1958. *Biophysical Chemistry*. New York: Academic Press.
- Fain GL, Quandt FN, Bastian BL, Gerschenfeld HM. 1978. Contribution of a cesium-sensitive conductance increase to rod photoresponse. *Nature*, 272 (5652): 467-469.
- Gauss R, Seifert R, Kaupp UB. 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*, 393 (6685): 583-587.
- Halliwel JV, Adams PR. 1982. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Research*, 250 (1): 71-92.
- Ingram SL, Williams JT. 1996. Modulation of the hyperpolarization-activated current (I_h) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons. *Journal of Physiology*, 492 (Pt 1): 97-106.
- Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. 1999. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (18): 12835-12839.
- Kaupp UB, Seifert R. 2001. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annual Review of Physiology*, 63: 235-257.
- Kodama I, Honjo H, Boyett MR. 2002. Are we lost in the labyrinth of the sinoatrial node pacemaker mechanism? *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 13 (12): 1303-1305.

- Krieger J, Strobel J, Vogl A, Hanke W, Breer H. 1999. Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29 (3): 255-267.
- Kusch J, Biskup C, Thon S, Schulz E, Nache V, Zimmer T, Schwede F, Benndorf K. 2010. Interdependence of receptor activation and ligand binding in HCN2 pacemaker channels. *Neuron*, 67 (1): 75-85.
- Kusch J, Thon S, Schulz E, Biskup C, Nache V, Zimmer T, Seifert R, Schwede F, Benndorf K. 2011. How subunits cooperate in homotetrameric HCN2 pacemaker channels. *Angenommen bei Nature Chemical Biology*.
- Lakatta EG, DiFrancesco D. 2009. What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47 (2): 157-170.
- Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. 2010. A coupled SYSTEM of intracellular Ca^{2+} clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circulation Research*, 106 (4): 659-673.
- Lipsius SL, Bers DM. 2003. Cardiac pacemaking: I_f vs. Ca^{2+} , is it really that simple? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35 (8): 891-893.
- Ludwig A, Zong XG, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, 393 (6685): 587-591.
- Ludwig A, Zong XG, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. 1999. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *Embo Journal*, 18 (9): 2323-2329.
- Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong XG, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, Hofmann F. 2003. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *Embo Journal*, 22 (2): 216-224.
- Luo L, Chang L, Brown SM, Ao H, Lee DH, Higuera ES, Dubin AE, Chaplan SR. 2007. Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat. *Neuroscience*, 144 (4): 1477-1485.

- Luthi A, McCormick DA. 1998. H-current: Properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron*, 21 (1): 9-12.
- Magee JC. 2000. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nature Reviews Neuroscience*, 1 (3): 181-190.
- Männikkö R, Elinder F, Larsson HP. 2002. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature*, 419 (6909): 837-841.
- McCormick DA, Pape HC. 1990. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and Its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurons. *Journal of Physiology-London*, 431: 291-318.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP. 1965. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12: 88-118.
- Moosmang S, Stieber J, Zong XG, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. 2001. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *European Journal of Biochemistry*, 268 (6): 1646-1652.
- Müller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E, Kaupp UB. 2003. HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *European Journal of Neuroscience*, 17 (10): 2084-2096.
- Nache V, Schulz E, Zimmer T, Kusch J, Biskup C, Koopmann R, Hagen V, Benndorf K. 2005. Activation of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channels is highly cooperative. *Journal of Physiology-London*, 569 (1): 91-102.
- Pape HC. 1996. Queer current and pacemaker: The hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annual Review of Physiology*, 58: 299-327.
- Pian P, Bucchi A, Robinson RB, Siegelbaum SA. 2006. Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP₂. *Journal of General Physiology*, 128 (5): 593-604.
- Pian P, Bucchi A, Decostanzo A, Robinson RB, Siegelbaum SA. 2007. Modulation of cyclic nucleotide-regulated HCN channels by PIP₂ and receptors coupled to phospholipase C. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 455 (1): 125-45.

- Proenza C, Tran N, Angoli D, Zahynacz K, Balcar P, Accili EA. 2002. Different roles for the cyclic nucleotide binding domain and amino terminus in assembly and expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (33): 29634-29642.
- Robinson RB. 2003. Hyperpolarization-activated cation currents: From molecules to physiological function. *Annual Review of Physiology*, 65: 453-480.
- Sakmann B, Neher E. 1995. *Single-Channel Recording*. New York: Plenum Press.
- Santoro B, Grant SG, Bartsch D, Kandel ER. 1997. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (26): 14815-14820.
- Schmidt T, Schutz GJ, Gruber HJ, Schindler H. 1996. Local stoichiometries determined by counting individual molecules. *Analytical Chemistry*, 68 (24): 4397-4401.
- Shi WM, Wymore R, Yu HG, Wu JY, Wymore RT, Pan ZM, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS. 1999. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circulation Research*, 85 (1): E1-E6.
- Sokolova O, Kolmakova-Partensky L, Grigorieff N. 2001. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure*, 9 (3): 215-220.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Taraska JW, Zagotta WN. 2007. Structural dynamics in the gating ring of cyclic nucleotide-gated ion channels. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14 (9): 854-860.
- Thollon C, Bedut S, Villeneuve N, Coge F, Piffard L, Guillaumin JP, Brunel-Jacquemin C, Chomar P, Boutin JA, Peglion JL, Vilaine JP. 2007. Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. *British Journal of Pharmacology*, 150 (1): 37-46.

- Ulbrich MH, Isacoff EY. 2007. Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nature Methods*, 4 (4): 319-321.
- Ulenz C, Siegelbaum SA. 2003. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channels by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry. *Neuron*, 40 (5): 959-70.
- Wahl-Schott C, Biel M. 2009. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (3): 470-494.
- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. 2001. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*, 411 (6839): 805-810.
- Wang J, Chen S, Nolan MF, Siegelbaum SA. 2002. Activity-dependent regulation of HCN pacemaker channels by cyclic AMP: Signaling through dynamic allosteric coupling. *Neuron*, 36 (3): 451-461.
- Wu S, Vysotskaya ZV, Xu X, Xie C, Liu Q, Zhou L. 2011. State-dependent cAMP binding to functioning HCN channels studied by patch-clamp fluorometry. *Biophysical Journal*, 100 (5): 1226-32.
- Yanagihara K, Irisawa H. 1980. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 385 (1): 11-19.
- Yellen G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419 (6902): 35-42.
- Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA. 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological Reviews*, 57 (4): 387-395.
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*, 425 (6954): 200-205.
- Zheng J, Zagotta WN. 2000. Gating rearrangements in cyclic nucleotide-gated channels revealed by patch-clamp fluorometry. *Neuron*, 28 (2): 369-74.

Zhou L, Siegelbaum SA. 2008. Pathway and endpoint free energy calculations for cyclic nucleotide binding to HCN channels. *Biophysical Journal*, 94 (12): L90-92.

Zolles G, Klöcker N, Wenzel D, Weisser-Thomas J, Fleischmann BK, Roeper J, Fakler B. 2006. Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron*, 52 (6): 1027-36.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Herz-Kreislauf-Physiologie der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Klaus Benndorf für die Überlassung des sehr interessanten Themas und die Betreuung bedanken.

Bei Dr. Jana Kusch bedanke ich mich für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, für ihre umfassende wissenschaftliche Anleitung, sowie für das Vorbild, welches sie wissenschaftlich für mich setzt.

Ich danke Prof. Dr. Eckhard Schulz für die mathematischen Analysen, ohne welche die Daten bei weitem nicht so aufschlussreich gewesen wären.

Prof. Dr. Christoph Biskup danke ich für die Hilfe bei der Datenauswertung und als Ritter im Kampf gegen die Technik.

Prof. Dr. Ingo Dahse danke ich für die Betreuung seitens der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

PD Dr. Thomas Zimmer danke ich für die Bereitstellung der RNA sowie Dr. Vasilica Nache für die Unterstützung in experimentellen Fragen.

Karin Schoknecht, Sandra Bernhard, Birgit Tietsch und Andrea Kolchmeier danke ich für die ausgezeichnete technische Assistenz. Nicole Baier möchte ich für die Hilfe bei der Bewältigung von Bürokratie im öffentlichen Dienst danken.

Ralf möchte ich gerne für die viel zu langen Antworten auf kurze Fragen danken. Annett und Melanie danke ich für ihr stetes Ohr für die Frustration und das Leid des Wissenschaftlerdaseins.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann, ohne den ich diese Arbeit nicht so schnell hätte beenden können und meinem Sohn, der seine Mutter tagsüber schon früh missen musste.

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dr. Jana Kusch

Prof. Dr. Klaus Benndorf

Prof. Dr. Eckhard Schulz

Prof. Dr. Christoph Biskup

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.